



UNIVERSITÀ DI PISA

Dipartimento di Farmacia

Corso di Laurea Specialistica in
Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

TESI DI LAUREA:

Disegno, sintesi e caratterizzazione di biorecettori
oligonucleotidici per applicazioni
terapeutico/diagnostiche in ambito cardiovascolare

Relatori:

Dott.ssa Lorena Tedeschi

Prof.ssa Paola Nieri

Candidata:

Claudia Boldrini

Anno Accademico 2012/2013

Indice

1	Introduzione.....	1
1.1	Molecole per il riconoscimento di marcatori molecolari che caratterizzano l'evoluzione dell'ipertrofia cardiaca	2
1.1.1	L'ipertrofia cardiaca	3
1.1.2	Gli aptameri.....	7
1.1.3	Osteopontina (OPN).....	10
1.1.4	L'approccio teranostico.....	13
1.2	Scelta e caratterizzazione di oligonucleotidi complementari tra loro per la messa a punto di un sistema di distacco termo-foto-indotto	14
2	Parte Sperimentale.....	15
2.1	Sintesi chimica dell'aptamero	16
2.2	Purificazione dei prodotti di sintesi.....	25
2.2.1	Cromatografia Liquida ad Elevata Prestazione, HPLC.....	25
2.2.2	Cromatografia di esclusione molecolare	27
2.3	Lettura allo spettrofotometro Fluostar.....	28
2.4	Saggi di affinità ELISA/ELONA	28
2.5	Marcatura degli oligonucleotidi complementari	31
2.6	Valutazione della persistenza nel tempo della fluorescenza del 6-FAM con cui è marcato il target.....	35
2.7	Dissociazione termica dei due oligonucleotidi complementari.....	36
2.8	Elettroforesi Capillare	44
3	Materiali e Metodi	48
3.1	Sintesi chimica dell'aptamero	48
3.2	Purificazione RNA	51
3.2.1	Cromatografia liquida ad Elevata Prestazione, HPLC	52
3.2.2	Cromatografia di esclusione molecolare	52
3.3	Lettura allo spettrofotometro Fluostar.....	52

3.4	Saggi di affinità ELISA/ELONA	54
3.5	Marcatura degli oligonucleotidi complementari	57
3.5.1	Modifica del probe scrambled per l'esposizione di	
	un gruppo sulfidrilico -SH.....	57
3.5.2	Marcatura del target scrambled con dye fluorescente	58
3.6	Misurazione della fluorescenza	58
3.7	Dissociazione termica dei due oligonucleotidi complementari.....	59
3.8	Elettroforesi Capillare	61
4	Risultati e Discussione	63
4.1	Sintesi, purificazione e resa.....	63
4.2	Valutazione Affinità	65
4.3	Marcatura degli oligonucleotidi complementari	68
4.4	Valutazione della persistenza nel tempo della fluorescenza	
	del 6-FAM con cui è marcato il target.....	72
4.5	Dissociazione termica degli oligonucleotidi complementari	73
4.6	Elettroforesi Capillare	76
	Bibliografia.....	83
	Ringraziamenti	86

Riassunto

Questo lavoro di tesi si inserisce nell'ambito di un Progetto Bandiera del CNR, il Progetto ENCODER (Engineered Nanostructures for Cellular imaging and for intracellular delivery of Optically active Drugs for cardiac hypERTrophy) della call Nanomax che prevede lo sviluppo e la caratterizzazione di nanostrutture complesse per imaging e/o terapia nell'ipertrofia cardiaca.

Creare un sistema utile allo stesso tempo sia per la diagnosi che per la terapia rappresenta lo scopo di questo progetto ed è definito approccio teranostico.

Il progetto ENCODER si propone di realizzare nanoparticelle coniugate con elementi di riconoscimento specifici, in grado di riconoscere e legare molecole espresse sulla superficie di cellule ipertrofiche e di far penetrare nelle cellule bersaglio molecole terapeuticamente attive.

La tesi si è sviluppata seguendo due filoni, uno riguardante la scelta e la caratterizzazione di un oligonucleotide diretto verso il marcatore della patologia, l'altro concernente la caratterizzazione di oligonucleotidi complementari tra loro per la messa a punto di un sistema di distacco termo-foto-indotto e il rilascio controllato di molecole farmacologicamente attive.

Sulla base di dati presenti in letteratura, è stato selezionato come marcatore molecolare dell'ipertrofia cardiaca la proteina osteopontina presente nella matrice extracellulare dei tessuti ipertrofici [Frangogiannis, *Physiol rev* 2012].

Come oligonucleotide deputato al riconoscimento dell'osteopontina abbiamo scelto un aptamero a RNA che è stato dimostrato legare e bloccare la proteina in cellule di tumore al seno e ridurre anche la progressione metastatica tumorale [Zhiyong Mi et al., *Molec. Therapy* 2009].

Abbiamo quindi sintetizzato questo aptamero a RNA utilizzando un sintetizzatore di acidi nucleici e successivamente siamo andati a purificarlo tramite passaggi sequenziali di deprotezione, desalting e cromatografia liquida HPLC.

Per valutare le proprietà di legame dell'aptamero verso l'osteopontina, sono stati eseguiti saggi di affinità come il test ELISA/ELONA in cui la capacità dell'aptamero di legare la proteina è stata confrontata con quella dell'anticorpo e la specificità è stata valutata rispetto ad una proteina di controllo.

Mediante Elettroforesi Capillare siamo poi andati ad analizzare la mobilità dell'osteopontina e dell'aptamero, separatamente ed in miscela in capillari rivestiti e riempiti con matrici semisolide.

Per quanto riguarda invece la coppia di oligonucleotidi complementari da utilizzarsi per il carico di molecole attive sulle nanoparticelle e il loro successivo rilascio alle cellule bersaglio, sono state studiate sequenze e modifiche chimiche alle estremità.

Le sequenze sono state scelte sulla base della loro non-complementarietà con sequenze di RNA messaggero umano e della loro energia di legame che determina specificità e temperatura di dissociazione.

Per legare la sequenza denominata probe alla nanoparticella abbiamo inserito una porzione spacer-SH, mentre per introdurre nel target complementare un fluorocromo è stata effettuata una marcatura dell'oligonucleotide con il marcatore Cy3TM Mono Reactive.

Il fluorocromo introdotto sul target può servire per valutare l'effettiva funzionalizzazione delle nanoparticelle e può essere successivamente accompagnato/sostituito con una molecola farmacologicamente attiva.

Per mettere a punto una procedura di attivazione foto-termica delle sequenze a doppio filamento presenti su particolari nanoparticelle in oro (per permettere rilascio del farmaco in terapia, o del fluorocromo nella diagnosi), siamo andati a misurare la temperatura di melting del doppio filamento formato dai due oligonucleotidi complementari.

Per via spettrofotometrica è stato monitorato l'effetto ipercromico della dissociazione delle sequenze, misurando l'assorbimento a 260 nm dell'oligonucleotide, in un tampone che mima la composizione salina dei fluidi biologici, durante una rampa di temperatura che comprende la temperatura di dissociazione prevista per il doppio filamento.

Anche in questo caso è stata valutata la mobilità in Elettroforesi Capillare dei due oligonucleotidi e del doppio filamento formato dall'associazione di essi.

Grazie a queste caratterizzazioni e funzionalizzazioni è possibile la coniugazione delle sequenze in esame con diversi tipi di nanoparticelle, ottenendo nanostrutture complesse di cui sarà valutata la biocompatibilità su cardiomiociti in coltura e la performance come agenti per imaging molecolare su cellule sane e ipertrofiche. La capacità di internalizzazione e l'efficacia diagnostica e terapeutica saranno poi stimate in vivo su modelli di ipertrofia cardiaca in animali da esperimento.

1 Introduzione

Questo lavoro di tesi si inserisce nell'ambito di un Progetto Bandiera del CNR, il Progetto ENCODER (Engineered Nanostructures for Cellular imaging and for intracellular delivery of Optically active Drugs for cardiac hypERTrophy) della call Nanomax che prevede lo sviluppo e la caratterizzazione di nanostrutture complesse per imaging e/o terapia nell'ipertrofia cardiaca. L'approccio *teranostico* (terapeutico e diagnostico) del progetto rappresenta un aspetto innovativo e deve necessariamente avvalersi di varie competenze che spaziano dalla biologia cellulare all'imaging mediante ultrasuoni o varie radiazioni elettromagnetiche, dalla chimica degli acidi nucleici alla chimica delle nanostrutture.

Il progetto ENCODER ha lo scopo di realizzare nanomateriali funzionalizzati capaci di legare biomarkers di patologie e di integrare funzioni diagnostiche e terapeutiche in una singola piattaforma (approccio teranostico). La capacità di legare specifici biomarkers permette di ottenere un trasporto selettivo del farmaco legato alla nanostruttura.

Le attività svolte nell'ambito di questo lavoro di tesi sono state quelle relative alle molecole a base oligonucleotidica da utilizzarsi come elementi di riconoscimento molecolare oppure come elementi per il rilascio controllato di molecole farmacologicamente attive all'interno di cellule ipertrofiche.

Il lavoro è stato quindi orientato su due filoni principali:

- Scelta e caratterizzazione di molecole per il riconoscimento di marcatori molecolari che caratterizzano l'evoluzione dell'ipertrofia cardiaca.
- Scelta e caratterizzazione di oligonucleotidi complementari tra loro per la messa a punto di un sistema di distacco termo-foto-indotto e il rilascio di molecole farmacologicamente attive.

1.1 Molecole per il riconoscimento di marcatori molecolari che caratterizzano l'evoluzione dell'ipertrofia cardiaca

L'ipertrofia cardiaca, patologia che prendiamo in esame, può essere dovuta ad una forma genetica oppure si può sviluppare come adattamento compensatorio ad un aumento del carico di lavoro del cuore. Ciò riduce la funzione cardiaca nel ventricolo sinistro.

L'ipertrofia cardiaca rappresenta un significativo fattore di rischio di arresto cardiaco ed un approccio teranostico può essere davvero utile nel bloccarne l'evoluzione.

Nei cardiomiociti, cioè le cellule in cui il fenomeno dell'ipertrofia cardiaca ha luogo, i meccanismi di traduzione del segnale coinvolti sono stati indagati a lungo e quindi è disponibile una certa varietà di targets molecolari.

La strategia del progetto si basa sulla coniugazione di nanostrutture con molecole capaci di

- 1) indirizzare le nanostrutture verso le cellule ipertrofiche
- 2) legare molecole marker espresse in modo diverso dalle cellule ipertrofiche
- 3) migliorare l'ingresso attraverso la membrana cellulare
- 4) rilasciare agenti diagnostici e terapeutici oligonucleotidici sia attraverso interazioni enzimatiche sia attivazione termica da fonte laser remota
- 5) fornire segnali fluorescenti in relazione alla quantità di nanoprobe oligonucleotidici che interagiscono con i targets intracellulari, valutando in questo modo l'effetto terapeutico.

Molecole oligonucleotidiche possono essere impiegate come ligandi molecolari per rilevare in modo specifico le cellule target e come strumenti chiave per consentire l'ingresso attraverso la membrana cellulare.

Per comprendere il razionale alla base delle scelte effettuate sono utili i cenni, riportati qui di seguito, sui meccanismi fisiopatologici dell'ipertrofia cardiaca, sugli effettori/marcatori coinvolti e sugli strumenti molecolari per la rilevazione di questi.

Alla luce infatti delle conoscenze attuali sulla patologia e sugli aptameri attualmente disponibili è stata scelta come marcatore della patologia la proteina di matrice osteopontina (OPN), sovra espressa nell'ipertrofia cardiaca [Frangogiannis, *Physiol rev* 2012].

Come molecola deputata al riconoscimento del marcatore molecolare abbiamo selezionato invece un aptamero oligonucleotidico che è stato dimostrato legare la proteina osteopontina con una costante di affinità K_d di 18 nmol/l [Zhiyong Mi et al., *Molec. Therapy* 2009].

1.1.1 L'ipertrofia cardiaca

L'ipertrofia comporta un aumento dello spessore del muscolo cardiaco e di solito si manifesta solo in una camera, il ventricolo sinistro.

L'ipertrofia ventricolare consiste nell'ispessimento delle pareti dei ventricoli del cuore. Sebbene l'ipertrofia ventricolare sinistra sia la più comune, l'aumento delle dimensioni può avvenire anche nel ventricolo destro o in entrambi i ventricoli (Figura 1.1).

L'ipertrofia cardiaca fisiologica o “cuore d'atleta” è la normale risposta all'esercizio fisico e alla gravidanza che risulta in un aumento della massa muscolare cardiaca e della capacità di pompaggio del ventricolo.

L'ipertrofia cardiaca patologica invece è la risposta a stress o disturbi come ipertensione, infarto del miocardio, arresto cardiaco o neurormoni. In questi tipi di patologie cardiache, si pensa che l'ipertrofia concentrica indotta da un sovraccarico pressorio abbia una funzione compensatoria diminuendo lo stress della parete e il consumo di ossigeno. Allo stesso tempo l'ipertrofia ventricolare è associata ad un significativo aumentato rischio di arresto cardiaco e aritmie maligne [Frey et al., Circulation 2004].

La risposta ipertrofica causata da un aumentato carico di lavoro, infatti, è un adattamento negativo ed è associata ad una più alta frequenza di mortalità dovuta ad arresto cardiaco. Sebbene inizialmente l'ipertrofia serva a sostenere l'output cardiaco e a normalizzare l'aumentato stress della parete in presenza di un carico esterno, una risposta ipertrofica persistente alla fine evolve in una disfunzione cardiaca in quanto il ventricolo ipertrofico si dilata [Frangogiannis, Physiol rev 2012].

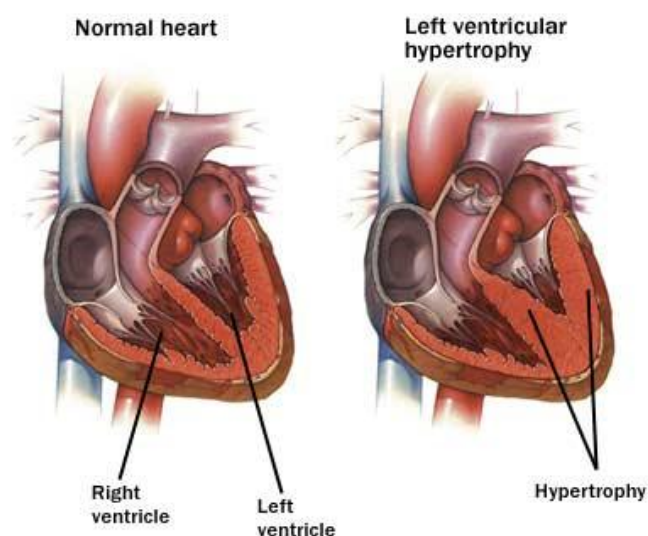


Figura 1.1: Cuore normale e cuore ipertrofico.

Negli anni '60 Meerson e colleghi hanno diviso la trasformazione ipertrofica del cuore in 3 stadi: (1) ipertrofia nascente, nella quale il carico eccede la gittata cardiaca, (2) l'ipertrofia compensatoria, nella quale il rapporto massa/carico di lavoro è riportato alla normalità e la gittata cardiaca a riposo viene mantenuta e (3) arresto cardiaco conclamato, con dilatazione ventricolare e progressiva diminuzione della gittata cardiaca nonostante l'attivazione continua del programma ipertrofico.

Cambiamenti morfologici significativi includono l'aumentata velocità di apoptosi, fibrosi, e dilatazione della camera.

L'ipertrofia comporta un aumento della massa muscolare ma il muscolo non aumenta la capacità di pompaggio, anzi accumula tessuto fibrotico miocardico. Il cuore può aumentare fino al 150% le sue dimensioni.

A livello cellulare, l'ipertrofia dei cardiomiociti è caratterizzata da un aumento delle dimensioni cellulari, un'aumentata sintesi proteica, ed un'accresciuta organizzazione del sarcomero che è l'unità funzionale e contrattile del muscolo striato cardiaco.

Classicamente si distinguono due differenti fenotipi: (1) l'ipertrofia concentrica dovuta ad un sovraccarico pressorio, che è caratterizzata dall'aggiunta parallela di sarcomeri e da una crescita laterale di singoli cardiomiociti, e (2) l'ipertrofia eccentrica dovuta al sovraccarico di volume o un precedente infarto, caratterizzata dall'aggiunta di sarcomeri in serie e da una crescita cellulare longitudinale.

Proteine Matricellulari nel cuore

Il cuore dei mammiferi è formato da cardiomiociti, non-cardiomiociti ed una estesa rete di matrice extracellulare (Figura 1.2). Sebbene i cardiomiociti costituiscano la maggior parte del volume del muscolo cardiaco adulto, i non-cardiomiociti sono più numerosi rispetto ai primi. Sulla base di criteri morfologici, solo il 30% delle cellule nel cuore di un ratto adulto sono identificate come cardiomiociti; il rimanente 70% sono non-cardiomiociti. Cellule endoteliali, fibroblasti e periciti sono abbondanti nel miocardio; inoltre in numero minore sono presenti macrofagi e mastociti nello spazio perivascolare e interstiziale. Gli elementi cellulari sono compresi in una complessa rete di matrice extracellulare che è composta principalmente da collagene di tipo I con piccole quantità di collagene di tipo III e V, fibronectina, proteoglicani e componenti della membrana basale.

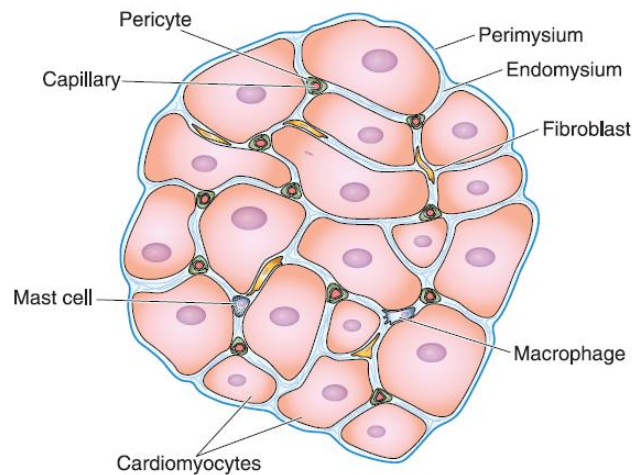


Figura 1.2: Morfologia di un cuore di mammifero.

La matrice extracellulare è un componente chiave degli organismi multicellulari in quanto forma un'intricata rete di proteine che riempie gli spazi extracellulari e fornisce supporto strutturale e organizzazione tissutale. In aggiunta al loro ruolo di fornire supporto meccanico, le proteine e le strutture della matrice extracellulare sono importanti regolatori di molecole segnale e modulano in modo critico le risposte cellulari. Una matrice formata da collagene è una caratteristica degli organismi multicellulari.

Le interazioni cellula-matrice mediano l'adesione, ma trasducono anche segnali che modulano la sopravvivenza cellulare, la proliferazione, il differenziamento.

Paul Bornstein coniò il termine *proteine matricellulari* per descrivere una famiglia di macromolecole extracellulari, strutturalmente non correlate, che interagiscono con recettori di superficie della cellula, fattori di crescita, proteasi e altri effettori, nonché con proteine strutturali di matrice. Queste proteine matricellulari giocano un ruolo limitato nell'architettura del tessuto, ma servono come collegamenti tra la matrice e le cellule, funzionando come integratori dinamici di segnali che modulano il comportamento cellulare in risposta a stimoli esterni. I componenti di questa famiglia sono la trombospodina-1, -2 e -4, SPARC, tenascina-C e -X, osteopontina (OPN), periostina e i membri della famiglia delle CCN.

La maggior parte delle proteine matricellulari sono espresse in modo minimo nei giovani cuori adulti normali ma sono upregolate in modo marcato dopo un danno cardiaco. Un numero crescente di prove suggerisce un ruolo importante per parecchi membri della famiglia matricellulare in varie condizioni cardiache fisiopatologiche; queste azioni sono

mediate attraverso effetti sui cardiomiociti e sulle cellule interstiziali e attraverso la modulazione dell'organizzazione e del metabolismo della matrice. Il muscolo cardiaco è straordinariamente sensibile a eventi dannosi innescati da ischemia, infiammazione, sovraccarico di pressione o di volume. Dal momento che il cuore ha una capacità rigenerativa trascurabile, una perdita estesa di cardiomiociti in seguito a infarto risulta nella formazione di una cicatrice costituita da collagene che fornisce supporto strutturale al ventricolo alterando nel contempo le sue proprietà meccaniche. Le proteine matricellulari indotte nel cuore infartuato sembra che servano come trasduttori di segnali chiave nella riparazione del cuore e agiscano come modulatori di migrazione, proliferazione e adesione cellulare. Nel miocardio con sovraccarico pressorio, le proteine matricellulari depositate nell'interstizio modulerebbero i segnali di citochine e fattori di crescita, influenzando la sensibilità dei cardiomiociti all'apoptosi e alla crescita ipertrofica, regolando il metabolismo della matrice e modulando il potenziale fibrogenico delle cellule infiammatorie e dei fibroblasti. Dal momento che la geometria e la funzione cardiaca dipendono in modo intricato dalle interazioni tra cellule del miocardio e matrice, gli effetti delle proteine matricellulari nella fisiopatologia cardiaca hanno profonde conseguenze sulla performance sistolica e diastolica del ventricolo [Frangogiannis, *Physiol rev* 2012].

1.1.2 Gli aptameri

Le sonde di affinità sono biopolimeri o piccole molecole che si legano ad una molecola target con alta affinità e specificità.

Gli aptameri fanno parte di questa categoria, vengono selezionati in vitro da ampie librerie di sequenze oligonucleotidiche casuali e sono usati per l'analisi di proteine.

Gli aptameri possono essere una valida alternativa all'uso degli anticorpi per quanto riguarda le analisi di affinità grazie a numerosi vantaggi.

Gli aptameri sono ligandi oligonucleotidici che sono selezionati per l'alta affinità di legame che hanno verso i target molecolari. Sono stati descritti sia aptameri a RNA che a singolo filamento di DNA, generalmente composti da 15-60 nucleotidi. Sono riportati target che vanno da piccole molecole organiche, come etanolamina e acetilcolina, a grandi complessi proteici ed anche cellule.

Il termine "aptamero" deriva dalla parola latina "aptus" (adattarsi) e dalla parola greca "meros" (parte). Gli aptameri hanno affinità nel range del nanomolare che sono comparabili con quelle degli anticorpi monoclonali.

La scelta di usare DNA o RNA come base per lo sviluppo dell'aptamero dipende da considerazioni pratiche e in parte da quella che è l'applicazione finale. L'RNA ha uno scheletro relativamente flessibile rispetto al DNA e in quanto tale ha una varietà più ampia di potenziali target molecolari. Tuttavia un inconveniente pratico dell'RNA è il fatto che è più soggetto a degradazione chimica ed enzimatica. Inoltre la selezione di aptameri a RNA è più laboriosa poiché il suo trattamento richiede più passaggi enzimatici. Comunque le problematiche sulla stabilità dell'RNA possono essere in parte superate utilizzando nucleotidi modificati [Ruigrok et al., Biochem. J. 2011].

Come implica il nome, gli aptameri sono idonei per applicazioni basate sul riconoscimento molecolare, applicazioni che includono la diagnostica e la terapia.

Le caratteristiche che sono più importanti per il successo di un saggio diagnostico sono l'affinità e la specificità del ligando che provvede al riconoscimento molecolare [Jayasena, Clinical Chemistry 1999].

La selezione di aptameri è un processo in vitro che può avere come bersaglio qualsiasi piccola molecola, biopolimero o cellula mentre la selezione degli anticorpi richiede un organismo biologico ed è inefficace con tossine e piccole molecole non immunogeniche.

Lo screening di anticorpi monoclonali è costoso e richiede tempo, l'attività varia da lotto a lotto, modificare i parametri di affinità è difficoltoso, le modifiche sono molto limitate. Inoltre la variazione di temperatura causa una denaturazione irreversibile degli anticorpi i quali hanno anche una vita limitata e una immunogenicità significativa. Per quanto riguarda l'analisi in Elettroforesi Capillare gli anticorpi si attaccano alle pareti del capillare, sono ingombranti (150 kDa) ed è difficile separare il complesso anticorpo-proteina dal solo anticorpo.

Lo screening di aptameri invece è economico e richiede poche settimane, l'attività è uniforme indipendentemente dal lotto e i parametri di affinità possono essere controllati su richiesta (è possibile costruire "smart aptamers"). Inoltre è disponibile un'ampia varietà di modifiche chimiche per diversificare proprietà e funzioni. Dopo una variazione di temperatura gli aptameri ritornano alla loro conformazione originale, hanno una vita illimitata e non esistono prove di una loro immunogenicità. Per quanto riguarda l'analisi in Elettroforesi Capillare gli aptameri non aderiscono alle pareti dei capillari, sono ligandi leggeri (5-15 kDa) ed è facile separare il complesso aptamero-proteina dal solo aptamero [Drabovich, Bioanalytical Chemistry, Lectures 2009].

Le caratteristiche peculiari degli aptameri li rendono molecole d'elezione per la realizzazione di strumenti terapeutici e di imaging molecolare, per cui, per questo lavoro di tesi, ci si è basati su un aptamero a RNA, [Zhiyong Mi et al., Molecular Therapy 2009] diretto contro la proteina di matrice Osteopontina, coinvolta nell'ipertrofia cardiaca. L'aptamero ha una costante di affinità K_d di 18 nmol/l. Dopo esposizione all'aptamero, i componenti critici enzimatici della via di traduzione del segnale dell'osteopontina e i mediatori della degradazione della matrice extracellulare sembrano ridursi in modo significativo. L'osteopontina è una fosfoproteina secreta che funziona come proteina di attacco cellulare e citochina che comunica attraverso due molecole di adesione cellulare. In particolare è una glicofosfoproteina acida idrofila che è sovraespressa nei tumori umani ed è la principale secreta dalle cellule maligne nei tumori metastatici avanzati. OPN è stata inizialmente caratterizzata nel 1979 come una fosfoproteina secreta da cellule epiteliali trasformate maligne. Fa parte della famiglia delle proteine SIBLING, glicoproteine N-legate con piccole regioni di legame per le integrine. La struttura molecolare di OPN è ricca di residui di aspartato e acido sialico e contiene domini funzionali unici che mediano la comunicazione cellula-matrice e cellula-cellula attraverso i recettori CD44 e i recettori per le integrine $\alpha_v \beta_3$ in molti processi sia normali sia patologici [Zhiyong Mi et al.,

Molecular Therapy Jan 2009]. Recentemente, piccole strutture a RNA a singolo filamento, conosciute anche come aptameri a RNA, sono emerse come valide alternative alla terapia basata sugli anticorpi.

Gli aptameri a RNA si legano specificamente a proteine target con alta affinità, sono abbastanza stabili, mancano di immunogenicità e generano risposte biologiche. Gli aptameri vengono sviluppati attraverso un metodo di selezione ripetitivo chiamato SELEX (systematic evolution of ligand by exponential enrichment) affinché riconoscano e leghino in modo specifico i loro target grazie a strutture tridimensionali complementari ben definite. Tipicamente le costanti di dissociazione per questi complessi aptamero-target si trovano nel range che va dall'alto picomolare al basso nanomolare. In quanto proteina secreta, l'osteopontina rappresenta un target ideale per l'inibizione mediata dall'aptamero a RNA.

SELEX è un processo di selezione ripetitivo in vitro costituito da passaggi sequenziali di selezione e amplificazione che possono efficacemente ridurre una libreria complessa di acidi nucleici con sequenze randomizzate ad una sottoclasse di una o più sequenze che si legano saldamente al target scelto.

Modifiche chimiche come la sostituzione con ammina o fluoro nella posizione 2' delle pirimidine può ridurre la degradazione da parte delle nucleasi. La biodistribuzione e la clearance degli aptameri può essere anche alterata dall'aggiunta chimica di molecole come il polietilenglicole o il colesterolo.

Recentemente un aptamero, il pegaptanib, è stato approvato per il trattamento della degenerazione maculare relativa all'età. Nel campo dell'oncologia, è stato dimostrato che l'aptamero a DNA GBI-10 derivato da una linea cellulare di glioblastoma umano si lega alla tenascina-C. In modo simile è stato dimostrato che aptameri a RNA legano le proteine Ku di riparazione del DNA con una risultante sensibilizzazione delle cellule di tumore al seno al farmaco etoposide.

1.1.3 Osteopontina (OPN)

OPN è una glicoproteina acida fosforilata che è stata originariamente identificata come proteina di matrice dell'osso, poi riconosciuta come citochina secreta nei fluidi corporei. OPN è espressa da molte cellule immunitarie ed è upregolata in risposta ad un danno tissutale.

Come proteina nascente ha un peso di circa 33 kDa ma, grazie alle estese modifiche post traduzionali, il suo peso molecolare aumenta a circa 44 kDa.

I domini funzionali della proteina forniscono prove delle due interazioni di legame con molecole di adesione (Figura 1.3). Due domini principali sono responsabili delle interazioni tra OPN e le integrine. La sequenza centrale RGD, arginina-glicina-aspartato, un motivo comune a molte proteine della matrice extracellulare, è responsabile del legame con le integrine $\alpha\beta1$, $\alpha\beta2$, $\alpha\beta5$, $\alpha\beta6$ e $\alpha5\beta1$.

Le interazioni di OPN con la molecola di adesione transmembrana CD44 sembra essere indipendente da RGD e può coinvolgere la parte terminale COOH della molecola (Figura 1.4). OPN è anche il substrato di varie metalloproteasi di matrice incluse le MMP-2, -3, -7, -9 e -12.



Figura 1.3: Struttura di OPN. I domini di legame con Ca^{++} sono colorati in rosso.

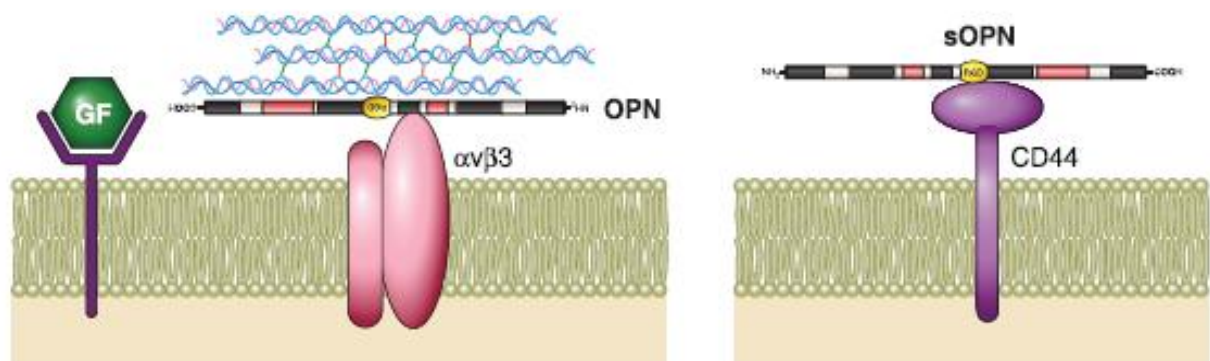


Figura 1.4: La sequenza RGD è coinvolta in varie attività di OPN integrine-mediate. OPN agisce come proteina che si lega alla matrice e modula i segnali dei fattori di crescita e come citochina (OPN solubile) che comunica attraverso CD44.

OPN può essere espressa da vari tipi cellulari inclusi osteoblasti, osteociti, cellule epiteliali, fibroblasti, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce vasali e cellule emopoietiche e viene secreta nei fluidi corporei. I monociti esprimono basse quantità di OPN; tuttavia la differenziazione da monociti a macrofagi è associata con un marcato aumento della sintesi della proteina. In questo modo i macrofagi presentano un'espressione costitutiva di OPN che può essere ulteriormente aumentata con l'attivazione dei segnali di AP-1 e NF-kB. OPN è anche espressa in modo elevato nelle cellule dendritiche immature. Angiotensina II, citochine proinfiammatorie e fattori di crescita sono capaci di stimolare l'espressione di OPN nei fibroblasti e nelle cellule muscolari lisce dei vasi. L'angiotensina II è un potente induttore di OPN nelle cellule muscolari lisce e nei fibroblasti.

L'espressione costitutiva di OPN nei macrofagi e la sua sintesi inducibile da parte di vari mediatori in molti tipi di cellule determinano una marcata upregulation di questa proteina nei tessuti danneggiati. Infatti un'aumentata espressione di OPN è stata osservata in processi infiammatori, angiogenici e fibrotici, nella guarigione delle ferite, in lesioni calcificate, nell'aterosclerosi e nelle neoplasie.

OPN nell'infarto miocardico

Una sovra espressione di OPN è stata osservata in modo consistente in modelli sperimentali di infarto miocardico. Usando un modello di danno tissutale cardiaco crio-indotto nel ratto, *Murry et al.* [Murry et al., Amer. J. of Pathol. 1994] hanno dimostrato una marcata upregulation di OPN nell'infarto miocardico. È stata praticata un'incisione addominale sulla linea mediana in ratti anestetizzati e indotto un ciclo di congelamento/scongelo del cuore che determina una regione riproducibile di necrosi nella parete posteriore del cuore. Gli eventi cellulari di guarigione di queste lesioni sono molto simili a quelli di riparazione dopo infarto miocardico. Abbondante osteopontina è stata rilevata nei cuori danneggiati nei primi tempi dopo l'evento. La proteina era localizzata in un sottogruppo di macrofagi che avevano infiltrato la zona.

OPN nell'ipertrofia cardiaca e fibrosi

La sintesi di OPN è upregolata in modo marcato in modelli sperimentali di ipertrofia cardiaca e fibrosi; la sua espressione è associata allo sviluppo di arresto cardiaco. Nei ratti spontaneamente ipertesi (SHR), un marcato aumento (di 10 volte) dei livelli di mRNA di

OPN nel miocardio è stato osservato in animali con arresto cardiaco scompensato ma non negli animali con ipertrofia compensatoria. OPN nel miocardio di questi ratti era espressa in modo predominante nelle cellule interstiziali.

L'angiotensina II sembra giocare un ruolo importante nel mediare l'upregulation di OPN nell'ipertrofia del miocardio. L'inibizione di ACE ha ridotto l'espressione di OPN nel miocardio nei ratti SHR. Inoltre l'infusione di angiotensina II induce un'aumentata espressione di OPN nel miocardio, associata con fibrosi e ipertrofia dei cardiomiociti.

Quindi, nella risposta del cuore ad un sovraccarico di pressione, OPN sembra mediare azioni fibrogeniche e ipertrofiche. La base della fibrosi OPN-indotta può essere dovuta all'aumentata chemiotassi e attivazione dei macrofagi, agli effetti diretti sull'adesione e proliferazione dei fibroblasti o alla facilitazione della fibrillo genesi di collagene.

Le azioni ipertrofiche di OPN possono essere dovute all'attivazione delle MAPK integrine-mediate.

OPN come biomarker in pazienti con problemi cardiaci

In aggiunta alle sue proprietà nella matrice extracellulare, OPN è secreta nel siero e nei fluidi corporei. Studi clinici recenti hanno suggerito che i livelli di OPN nel plasma possono servire come marker per la dilatazione del ventricolo sinistro. L'OPN del plasma può essere particolarmente utile come indicatore di rimodellamento sfavorevole e indicatore di mortalità in pazienti con arresto cardiaco o ischemie [Frangogiannis, *Physiol rev* 2012].

1.1.4 L'approccio teranostico

I disturbi cardiovascolari sono una delle principali cause di morte nel mondo; l'arresto cardiaco è associato ad una significativamente ridotta salute fisica e mentale e ad un abbassamento della qualità di vita. Sebbene molti pazienti con problemi cardiovascolari sopravvivano per molti anni, la progressione della malattia è associata con un tasso complessivo di mortalità all'anno del 10%; l'attacco di cuore è la prima causa di ospedalizzazione in persone sopra i 65 anni. Uno dei più notevoli risultati conseguiti alla fine del secolo scorso sono stati gli studi sulle proprietà di nanomateriali biologici e sintetici. I progressi nelle nanoscienze, nelle nanotecnologie e nella nanomedicina hanno portato alla produzione di nuovi materiali e strumenti per vari scopi scientifici e terapeutici che sono applicabili nella diagnostica molecolare e nel migliorare la scoperta, il disegno e il trasporto dei farmaci.

Nello sviluppare il modello della *medicina predittiva, preventiva e personalizzata*, un punto fondamentale è diagnosticare, osservare il processo di trattamento della trasformazione del tessuto e analizzare i parametri precoci (biomarkers) per stimare/predire la riuscita del trattamento. Uno degli obiettivi della medicina personalizzata è un targeting del farmaco altamente specifico e sensibile, obiettivo che si comprende bene con la frase "dare ai pazienti il giusto farmaco per la loro malattia alla giusta dose e al momento giusto". Le nanobiotecnologie favoriscono l'integrazione della diagnostica e della terapia per una medicina personalizzata, stabilendo terapie specifiche che si adattano meglio ad un individuo [Spivak et al., The EPMA Journal, 2013].

Raggiungere un sito specifico per la terapia, operazione denominata "targeting", è l'obiettivo specifico dei Delivery Systems. Con questo termine viene indicato qualsiasi sistema o "carrier" destinato al trasporto di un farmaco per il suo rilascio controllato.

Il termine "teranostica" è stato coniato per definire i continui sforzi in ambito clinico per sviluppare terapie più specifiche e personalizzate e per combinare capacità diagnostiche e terapeutiche in un singolo agente [J. Xie et al., Advanced Drug Delivery Reviews 2010].

Una definizione semplice di teranostica fatta da Warner è "diagnosi più terapia". Infatti la nanomedicina teranostica è la realizzazione della nanotecnologia per la preparazione di questi tipi di farmaci. Questo termine definisce un sistema nanoterapeutico integrato che può diagnosticare, consegnare una terapia mirata e monitorare la risposta alla terapia. Una tecnica combinata risulterà in una accelerazione dello sviluppo di un farmaco, un miglior

controllo della malattia, ridotti rischi e minori costi [N. Ahmed, Drug Discovery Today volume 17, sept 2012].

1.2 Scelta e caratterizzazione di oligonucleotidi complementari tra loro per la messa a punto di un sistema di distacco termo-foto-indotto

Coppie di oligonucleotidi complementari, la cui dissociazione può essere indotta per via termica, possono costituire un sistema interessante per il rilascio localizzato e selettivo di molecole terapeuticamente attive.

Nell'ambito del progetto Encoder è prevista un'attività su nanoparticelle che si surriscaldano se colpite da una radiazione di opportuna lunghezza d'onda e la caratteristica peculiare di sequenze a doppio filamento di RNA o DNA di dissociarsi ad una data temperatura offre un interessante sistema per studiare il rilascio controllato indotto termicamente.

Per questa finalità sono state studiate le sequenze di una coppia di oligonucleotidi e caratterizzata la loro dissociazione in una soluzione che, come composizione salina, mima i fluidi biologici.

2 Parte Sperimentale

Le attività sperimentali svolte per questo lavoro di tesi hanno riguardato i vari aspetti affrontati per il disegno, la preparazione e la caratterizzazione dei diversi oligonucleotidi previsti per le nanostrutture terapeutico-diagnostiche del progetto Encoder (Figura 2.1).

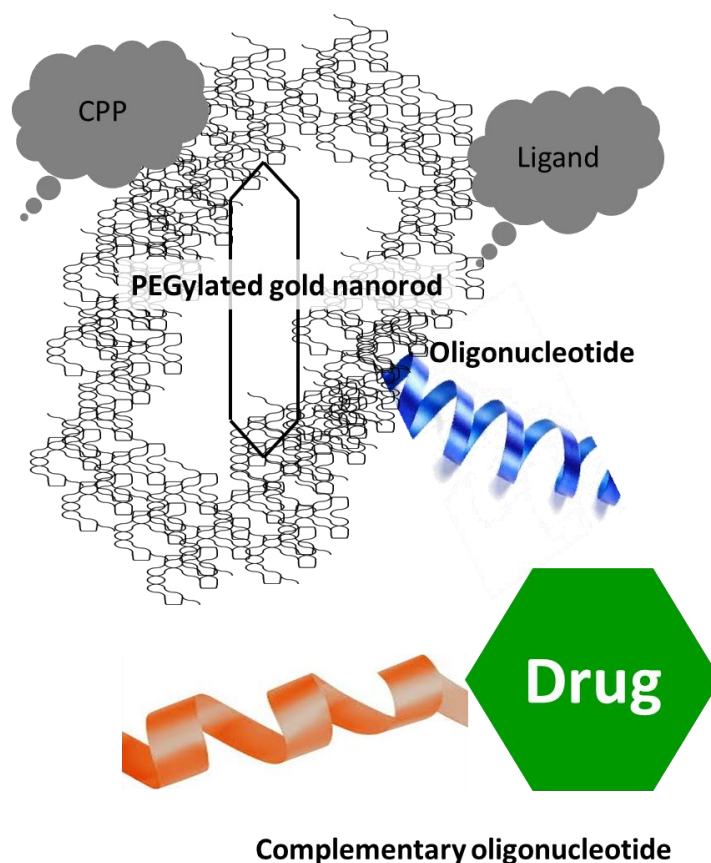


Figura 2.1: Nanostrutture ed oligonucleotidi del progetto Encoder.

Gli oligonucleotidi sono stati sintetizzati e purificati ed alcuni sono stati successivamente marcati per rendere possibile o facilitare il loro ancoraggio e la loro rilevazione. Le sequenze ottenute sono state quindi caratterizzate in termini di capacità di legame verso il loro bersaglio biologico (l'aptamero OPN) o in termini di temperatura di dissociazione (le coppie di oligonucleotidi complementari definite probe-target) in soluzioni tampone che mimano i fluidi biologici.

La valutazione del legame al bersaglio specifico è stata effettuata mediante un saggio immunoenzimatico su piastra simile all'ELISA (ELONA) e mediante elettroforesi capillare.

Mentre la valutazione della temperatura di dissociazione è stata effettuata per via spettrofotometrica sottoponendo le sequenze appaiate ad un incremento della temperatura.

I prodotti e i dati ottenuti sono stati poi forniti a coloro che, all'interno del progetto, si occupano di sviluppare le nanostrutture evidenziabili per via ecografica o con altre tecniche, e sono quindi essenziali per la realizzazione delle previste nanostrutture per il riconoscimento molecolare.

2.1 Sintesi chimica dell'aptamero

Nel 1983 avvenne una svolta nel campo della sintesi chimica con l'introduzione di un nuovo processo basato sull'uso di monomeri di fosforamidite e catalisi mediata dal tetrazolo.

La sintesi oligonucleotidica è un processo semplice ma con implicazioni di ampia portata ed è estremamente utile nelle procedure di laboratorio. È usata anche per ottenere primers, importanti in metodi come la PCR. Produrre un oligonucleotide personalizzato è utile perché si legherà solamente alla regione di DNA che è complementare alla sequenza di tale oligonucleotide. Questo consente a specifici segmenti di DNA di essere amplificati.

La fosforamidite è un normale nucleotide ma con gruppi protettori, come il gruppo tritile, aggiunti alla sua ammina reattiva, al gruppo idrossilico e ai gruppi fosfato (Figura 2.2). Questi gruppi protettori impediscono reazioni indesiderate e favoriscono la formazione durante la sintesi del prodotto desiderato.

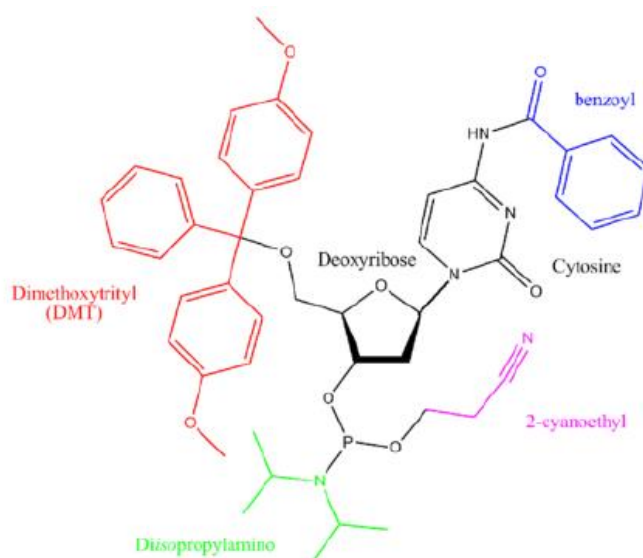


Figura 2.2: Gruppi protettori su un deossiribonucleotide.

Tali gruppi vengono poi rimossi dopo il completamento della sintesi. Il legame al supporto solido avviene attraverso il carbonio in 3' e la sintesi procede dall'estremità 3' all'estremità 5', diversamente da ciò che accade in ambito biologico. La sintesi avviene in fase solida, in condizioni anidre ed in atmosfera inerte di Argon anidro. Il supporto solido è vetro di porosità controllata di 5 micron con pori e canali dove si trova attaccato il nucleotide protetto. La sintesi procede attraverso una serie di cicli composti da quattro passaggi che sono ripetuti finché è attaccato il nucleotide all'estremità 5' (© 2005, 2010 and 2011, Integrated DNA Technologies).

In laboratorio abbiamo utilizzato il sintetizzatore di acidi nucleici *Applied Biosystems 3400 DNA Synthesizer* per ottenere l'aptamero diretto verso l'osteopontina (Figura 2.3). Questo aptamero a RNA ha una sequenza oligonucleotidica lunga circa 40 basi.



Figura 2.3: Sintetizzatore di acidi nucleici.

Zhiong Mi *et al.* [Zhiyong Mi *et al.*, Molec. Therapy 2009] hanno dimostrato l'effetto di un aptamero a RNA diretto contro l'osteopontina su misure *in vitro* e *in vivo* di crescita e metastasi in cellule di tumore al seno umano. Basandoci sull'efficacia di tale aptamero di riconoscere l'osteopontina e di legarla, abbiamo deciso di selezionarne la sequenza e sintetizzare questo aptamero utilizzando il sintetizzatore di acidi nucleici. La sequenza dell'aptamero è

5'- CGGCCACAGAAUGAAAAACCUCAUCGAUGUUGCAUAGUUG-3'

e presenta le seguenti caratteristiche:

- ✓ A e G ribo
- ✓ 2' OMe C e U
- ✓ Amino-modifier C6 in 5'
- ✓ 3' FITC

Il primo nucleotide all'estremità 3' è attaccato al supporto solido CPG e presenta una molecola di fluoresceina isotiocianato, che esibiranno tutte le sequenze, importante per poter rilevare l'aptamero oligonucleotidico non solo in assorbanza ma anche tramite fluorescenza. Il gruppo amminico all'estremità 5' viene introdotto per ancorare la molecola alla nanoparticella. Inoltre, per rendere le pirimidine citosina e uracile meno suscettibili all'azione delle nucleasi che degradano RNA, la posizione 2' dello zucchero viene modificata introducendo un gruppo alchilico.

Modelli teorici di struttura secondaria per l'aptamero sono stati determinati tramite il programma mFold, su <http://eu.idtdna.com/unafold/Home/Index>, il quale fornisce le strutture secondarie più termodinamicamente favorevoli inserendo la sequenza dell'oligonucleotide e altri parametri. La struttura con una variazione di energia libera di Gibbs, ΔG , più negativa ($\Delta G = -10,374$) e quindi quella favorita, è rappresentata in Figura 2.4.

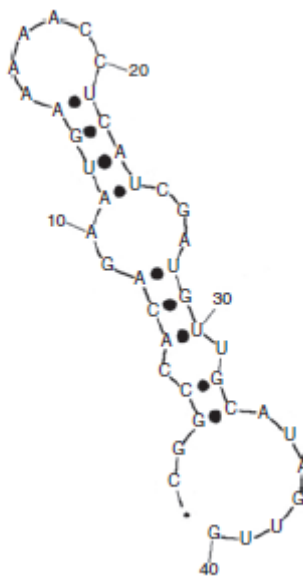


Figura 2.4: Struttura secondaria più favorita dell'aptamero.

La seconda struttura più favorita in ordine di energia libera ($\Delta G = -9,121$) è quella rappresentata in Figura 2.5.

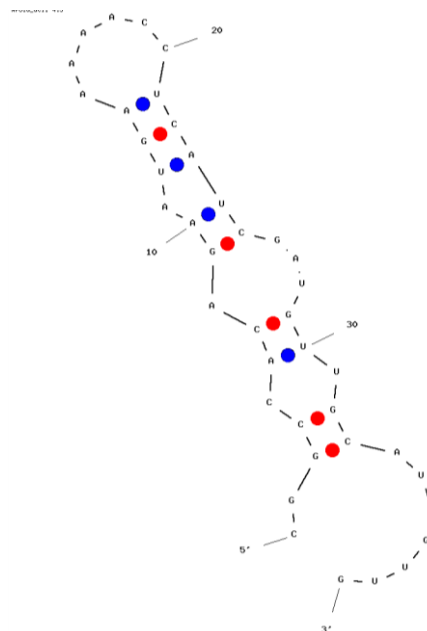
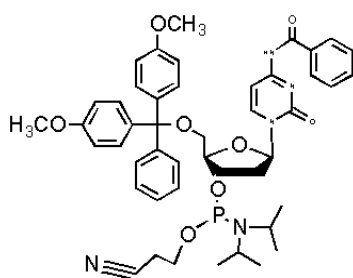


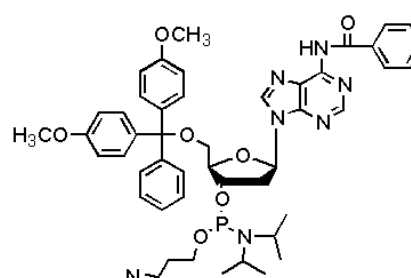
Figura 2.5: Struttura secondaria dell'aptamero con energia libera $\Delta G = -9,121$.

Materiali:

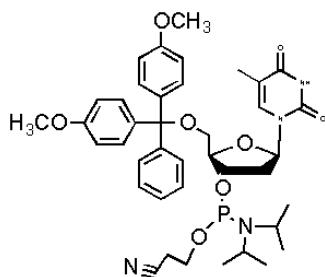
- Soluzioni dei 4 monomeri di fosforamidite (tutti i gruppi ossidrilici al 5' devono essere bloccati con il gruppo DMT, dimetossitritile, per tutte e quattro le basi, Figura 2.6)
- Tutti i legami fosfato devono essere bloccati con un gruppo cianoetilico
- Soluzioni Blocking
- Camera di reazione e un tipo di supporto solido come CPG "controlled pore glass"
- Il supporto solido dovrebbe essere preparato con la prima base desiderata già attaccata tramite legame estereo al gruppo ossidrilico in 3'
- Acido dicloroacetico o tricloroacetico
- Tetrazolo
- Anidride acetica e N-metilimidazolo
- Iodio diluito in una soluzione di acqua/piridina/tetraidrofurano
- Idrossido di ammonio concentrato



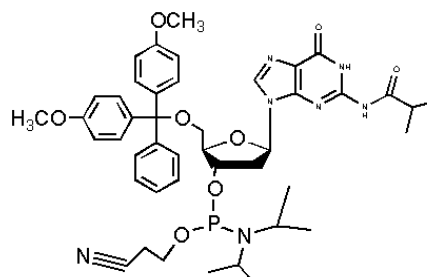
N-4-benzoyl-deoxycytidine
phosphoramidite



N-6-benzoyl-deoxyadenosine
phosphoramidite



deoxythymidine
phosphoramidite



N-2-isobutryl deoxyguanosine
phosphoramidite

Figura 2.6: Fosforoammiditi usate nella sintesi chimica di DNA.

Primo passaggio: Deprotezione

La prima base, che è attaccata al supporto solido, è inizialmente inattiva perché tutti i siti attivi sono stati bloccati o protetti. Il gruppo tritile all'estremità 5' è un carbocatione che rimane tale perché siamo in ambiente anidro, è colorato in arancione ed è indice di efficienza della reazione. Per aggiungere la base successiva, deve essere rimosso il gruppo DMT che protegge l'ossidrile in 5'. Ciò viene fatto aggiungendo una base, acido dicloroacetico o tricloroacetico in diclorometano (DCM), alla colonna di reazione. Il gruppo idrossilico in 5' è ora l'unico reattivo sul monomero e ciò assicura che l'aggiunta della base successiva avverrà esclusivamente su questo sito. La colonna di reazione è poi lavata per rimuovere sottoprodotti e residui di acido.

Secondo passaggio: Condensazione

La base successiva non può essere aggiunta se prima non viene attivata. Ciò viene fatto aggiungendo tetrazolo che stacca uno dei gruppi che proteggono il legame fosfato. Questa base è poi aggiunta alla colonna di reazione. Il gruppo idrossilico al 5' attivo della base precedente e il fosforo recentemente attivato si legano per connettere debolmente le due basi (Figura 2.7). Questo forma un legame fosfito instabile. La colonna di reazione è lavata per rimuovere tetrazolo, base non legata, sottoprodotti.

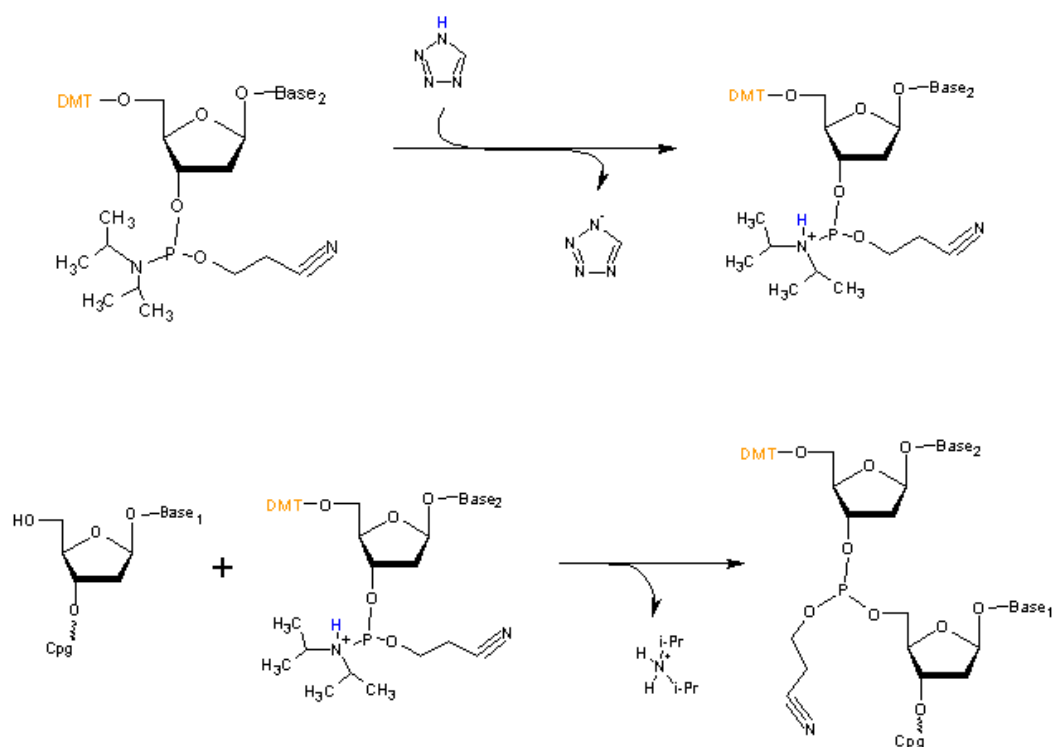


Figura 2.7: Condensazione.

Terzo passaggio: Capping

Quando la base attivata viene aggiunta alla colonna di reazione, alcune di esse non si legano all'ossidrilico in 5' attivo della precedente base. Se questo gruppo è lasciato non reagito, è possibile che nei passaggi successivi reagisca con altre basi. Ciò risulterebbe in un oligonucleotide con delezioni. Per prevenire tale evento il 5' attivo non legato viene incappucciato con un gruppo protettivo che impedisce che quel filamento cresca ancora (Figura 2.8). Ciò viene fatto aggiungendo anidride acetica e N-metilimidazolo alla colonna di reazione. La base viene incappucciata perché subisce acetilazione. La colonna è poi lavata per rimuovere i residui di anidride acetica o N-metilimidazolo.

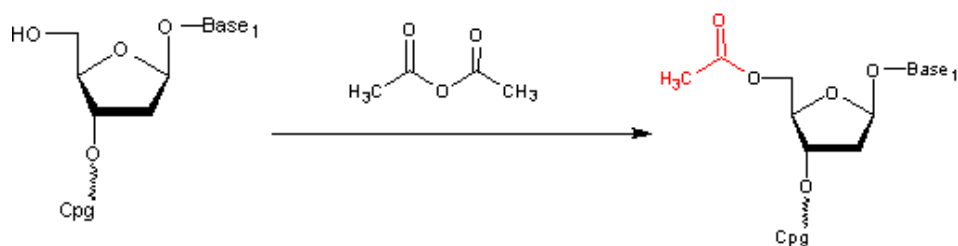


Figura 2.8: Capping.

Quarto passaggio: Ossidazione

Nel secondo passaggio la base successiva era aggiunta alla precedente dando luogo ad un legame fosfito instabile. Per rendere stabile questo legame, viene aggiunta alla colonna una soluzione di iodio in acqua, piridina e tetraidrofurano. Il legame fosfito instabile è ossidato a formare un legame fosfato molto più stabile (Figura 2.9).

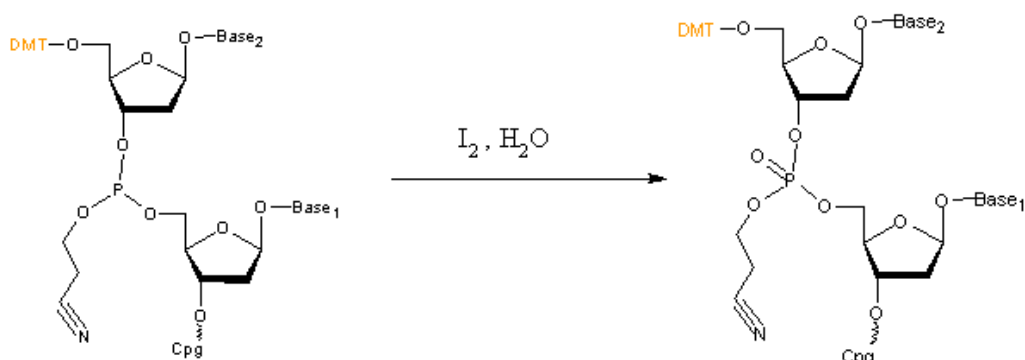


Figura 2.9: Ossidazione.

Tutti i passaggi dal primo al quarto sono ripetuti finché tutte le basi desiderate sono aggiunte all'oligonucleotide (Figura 2.10).

Ogni ciclo di sintesi ha un'efficacia di circa il 98-99% [www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/Molstudents/spring2003/Holmberg/oligonucleotides_synthesis.html].

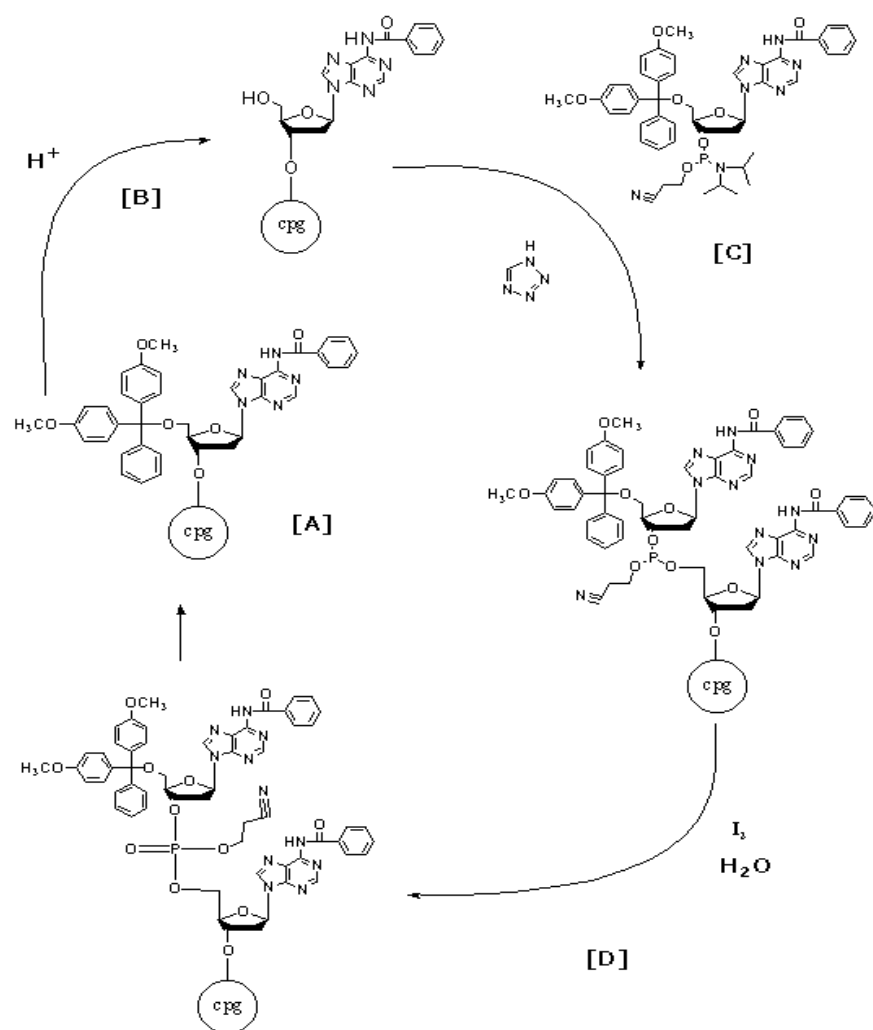


Figura 2.10: Ciclo di sintesi.

2.2 Purificazione dei prodotti di sintesi

Una volta sintetizzata la sequenza, dobbiamo rimuovere i gruppi protettori rimasti sulle catene come quelli delle basi azotate, i gruppi β -cianoetilici, il gruppo dimetossitritile e quello acetile.

Trattiamo l'oligonucleotide ancora attaccato al supporto solido con una soluzione di dietilammina (DEA) in acetonitrile, seguito da un lavaggio con solo acetonitrile per evitare reazioni di cianoetilazione in cui l'acrilonitrile che si forma come sottoprodotto della deprotezione può andare ad alchilare gruppi amminici. I gruppi protettori vengono rimossi effettuando un trattamento "overnight" a 55° C con idrossido di ammonio concentrato (NH₄OH) ed etanolo assoluto.

Per deproteggere la posizione 2' degli zuccheri nei monomeri protetti con il gruppo *tert*-butil-dimetil-silile, TBDMS, si procede al trattamento delle sequenze con TEA·3HF/DMF 3:1 per 3 ore a 55° C sotto cappa.

Aggiungiamo RNA Precipitation Mix, lasciamo overnight a -20° C e il giorno dopo centrifughiamo per ottenere un precipitato. Prepariamo soluzioni in acqua ed effettuiamo una filtrazione con *filtri 3000 MWCO Microcon (Millipore)* per rimuovere sequenze corte non reagite, sottoprodotti e reagenti in eccesso.

Abbiamo ottenuto un "flow through" FT, che contiene le sostanze di piccole dimensioni che hanno attraversato il filtro, e un "retentato" RET, che dovrebbe contenere l'aptamero, costituito da quelle sostanze che sono state trattenute dal filtro e rivoltate in nuove vials.

Andiamo a leggere le varie soluzioni acquose in HPLC, cromatografia liquida.

2.2.1 Cromatografia Liquida ad Elevata Prestazione, HPLC

HPLC sta per "Cromatografia Liquida ad Elevata Prestazione" ed è un tipo di cromatografia che permette di separare due o più composti in un solvente sfruttando l'affinità per una fase stazionaria posta all'interno della colonna cromatografica ed una fase mobile che fluisce attraverso essa.

Una sostanza più affine alla fase stazionaria impiega un tempo maggiore a percorrere la colonna cromatografica (*tempo di ritenzione*, tempo impiegato da ciascun analita per emergere dalla colonna) rispetto ad una più affine alla fase mobile.

Il campione da analizzare è iniettato all'inizio della colonna cromatografica dove è spinto dalla fase mobile attraverso la fase stazionaria applicando una determinata pressione.

Alla fine della colonna è applicato un rilevatore che permette di analizzare e identificare le sostanze in uscita.

Lo strumento è un HPLC *Dionex Chromeleon Ultimate 3000* ed è composto da una pompa che riunisce quattro solventi da uno o più reservoirs, miscelati come definito, e poi direziona questa miscela verso il sistema. La soluzione di interesse, il campione, viene iniettato in questo flusso attraverso un autocampionatore e separato in colonna nelle singole frazioni. Per ottimizzare il processo di separazione viene usato un compartimento della colonna termostato. Quando una sostanza raggiunge la cella del detector, viene prodotto un segnale che è proporzionale alla concentrazione della sostanza. Un segnale con un profilo che corrisponde ad una distribuzione gaussiana viene detto "picco". Il nostro strumento si basa sul principio della cromatografia a scambio ionico in gradiente ed utilizza due tipi di tamponi: il tampone A costituito da Tris, NaCl e acetonitrile e il tampone B che contiene solo Tris e acetonitrile. Il tampone A presenta una maggiore concentrazione di sali rispetto al B. Lo strumento crea un gradiente di sali, variando la quantità dei due tamponi, momento per momento ed è questo gradiente che permette l'eluizione delle specie ioniche. Gli oligonucleotidi a DNA o RNA, contenendo gruppi fosfato, presentano cariche negative. Più lunga è la sequenza oligonucleotidica, più gruppi fosfato saranno presenti, maggiore è la concentrazione di sali necessaria, più tardi verrà eluito l'oligonucleotide.

Lavoriamo alla temperatura di 50° C alla quale gli oligo sono parzialmente denaturati e i tamponi sono poco viscosi quindi non creano problemi di pressione.

L'HPLC Dionex legge a quattro lunghezze d'onda: a 260, 280, 390 e 490 nm.

A 260 nm legge gli assorbimenti tipici del DNA e RNA, a 280 nm la spalla degli oligonucleotidi, a 490 nm l'assorbimento di molecole fluorescenti.

Dopo l'HPLC analitica per osservare il profilo dell'oligonucleotide da noi sintetizzato, andiamo a fare la corsa preparativa in cui cerchiamo di raccogliere diverse frazioni dell'aptamero. Nelle varie preparative abbiamo ottenuto 3 soluzioni: picco 1, picco 2, picco TOT che comprende entrambi i picchi.

Al fine di eliminare i sali contenuti in soluzione dovuti ai tamponi dell'HPLC andiamo ad effettuare la cromatografia di esclusione tramite la colonna Sephadex.

2.2.2 Cromatografia di esclusione molecolare

La cromatografia di esclusione molecolare o gel filtrazione è utilizzata per separare analiti in base alle dimensioni utilizzando gel cioè composti organici polimerici che possiedono una rete tridimensionale di pori. È costituita da una colonna *Sephadex G-25* formata da polimeri di destrano. Viene spesso usata per allontanare i sali da campioni eluiti dopo cromatografia a scambio ionico.

Le molecole piccole entrano nei pori compiendo un tragitto tortuoso e quindi impiegano più tempo per uscire, quelle grandi passano all'esterno delle particelle ed escono prima.

Nel nostro caso l'aptamero oligonucleotidico uscirà prima dalla colonna cromatografica e verrà raccolto in una falcon, i sali usciranno dopo e il loro passaggio sarà segnalato dallo sviluppo di corrente tra due elettrodi.

La soluzione raccolta in uscita dalla Sephadex viene ridotta di volume utilizzando il *Rotavapor® R II Buchi*, l'evaporatore rotante.

È uno strumento che serve ad allontanare i solventi da una soluzione desiderata sfruttando l'evaporazione a bassa pressione.

È formato da cinque elementi principali:

- un pallone di evaporazione contenente la soluzione
- un bagnetto termostato in cui si immerge il pallone
- un meccanismo motorizzato per provocare la rotazione
- un condensatore inclinato per i vapori che si sviluppano
- un pallone di raccolta dei solventi condensati

Il sistema montato deve garantire la tenuta del vuoto, grazie al quale si favorisce l'evaporazione.

Infatti il funzionamento dello strumento si basa sul fatto che il vuoto, diminuendo la temperatura di ebollizione del solvente, va a favorire l'evaporazione del solvente portando quindi all'effetto desiderato di riduzione del volume del campione. La rotazione del pallone, aumentando la superficie di soluzione, incrementa ulteriormente la velocità di evaporazione. I vapori di solvente generati si allontanano incontrando la superficie fredda del condensatore e qui condensano formando gocce che cadono nel pallone di raccolta.

Successivamente siamo andati a liofilizzare i campioni picco 1, picco 2 e picco TOT dell'oligonucleotide. Abbiamo introdotto i campioni in azoto liquido per ghiacciarli completamente e poi li abbiamo messi nel liofilizzatore che, applicando il vuoto, va ad

allontanare l'acqua da un prodotto per sublimazione. I campioni liofilizzati vengono conservati in questo modo a -20° C e scongelati al momento del bisogno.

2.3 Lettura allo spettrofotometro Fluostar

Prima di iniziare la caratterizzazione dell'aptamero, è stata fatta una lettura di assorbanza a 260 nm con lo spettrofotometro *Fluostar* allo scopo di conoscere la quantità precisa di campione che abbiamo. Fluostar è un lettore di piastre multifunzionale e possiede un'ampia varietà di applicazioni. Il campione liofilizzato è stato solubilizzato in acqua per ottenere 200 ul di soluzione a concentrazione nota. Il valore di assorbanza rilevato al Fluostar differisce rispetto a quello di un comune spettrofotometro in quanto il cammino ottico non è 1 cm. Possiamo tuttavia ricondurlo a questo utilizzando l'equazione

$$\text{Abs spettrofotometro} = 1,775 * \text{Abs Fluostar} + 0,02.$$

Da questa equazione si possono ricavare i valori di assorbanza e successivamente risalire alle concentrazioni dei campioni caricati tramite l'equazione:

Concentrazione [uM] = (Abs spettrofotometro/ε) * 1000 dove epsilon è il coefficiente di estinzione molare dell'oligonucleotide.

In seguito, conoscendo la concentrazione della soluzione UV, possiamo calcolare la concentrazione della soluzione stock e risalire alla quantità di campione che abbiamo.

2.4 Saggi di affinità ELISA/ELONA

L'affinità che possiede l'aptamero da noi sintetizzato verso l'osteopontina viene valutata attraverso saggi ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). L'ELISA è una tecnica molto utilizzata, basata sulla coniugazione chimica di enzimi (quali ad es. la fosfatasi alcalina o la perossidasi) con anticorpi o antigeni. L'attività di questi enzimi è facilmente monitorabile e consente di quantificare la concentrazione di complesso coniugato con facilità e precisione.

Quando questi saggi prevedono l'utilizzo, al posto dell'anticorpo, di un aptamero marcato con fluoresceina e specifico per la rilevazione del target di interesse vengono chiamati ELONA (Enzyme Linked OligoNucleotide Assay).

Andiamo ad effettuare un saggio di tipo indiretto in cui copriamo con la proteina OPN il fondo dei pozzetti di una piastra multiwell funzionalizzata con N-oxysuccinimide. Tali gruppi reagiscono con i gruppi amminici primari delle proteine permettendo di ottenere pozzetti funzionalizzati con la proteina (Figura 2.11).

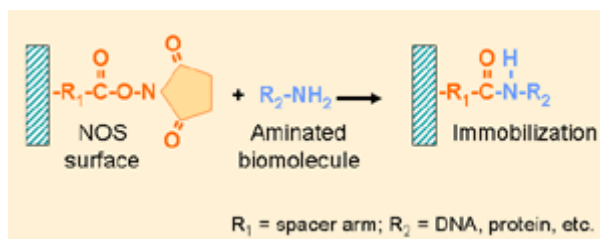


Figura 2.11: La reazione di N-Oxysuccinimide con biomolecole che presentano gruppi amminici permette l'immobilizzazione di proteine sulla superficie della piastra DNA-BIND®.

L'affinità dell'aptamero verso l'osteopontina viene stimata paragonando la sua capacità di legare la proteina con quella dell'anticorpo specifico verso OPN (*Mab to OPN*, Meridian Life Science) e la specificità è valutata come capacità di legare l'osteopontina rispetto a una proteina di controllo come può essere l'albumina, la quale rappresenta la proteina plasmatica principalmente presente nel sangue umano. In laboratorio utilizziamo l'albumina bovina serica (BSA). Per questo motivo metà della piastra viene funzionalizzata con OPN, mentre sull'altra metà viene immobilizzata la proteina BSA.

Tratto i pozzetti con le soluzioni degli oligonucleotidi marcati con fluoresceina. Testiamo due concentrazioni dell'aptamero, una bassa concentrazione ed una alta. Per controllo negativo svolgiamo gli stessi passaggi anche con un oligonucleotide marcato con fluoresceina ma non specifico per l'osteopontina (IDT2090).

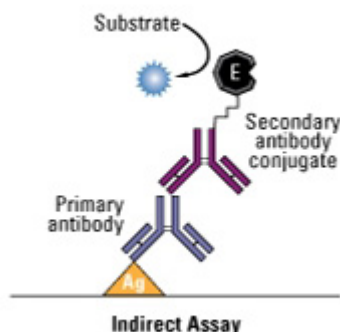


Figura 2.12: Elisa di tipo indiretto.

Dopo alcuni lavaggi con PBS 1X per rimuovere ciò che non si è legato, aggiungo la soluzione di anticorpo primario che riconosce la fluoresceina dell'oligonucleotide. Successivamente lavo e tratto con la soluzione di anticorpo secondario che riconosce il primario ed è coniugato con l'enzima HRP (horse-radish peroxidase) il quale converte il substrato OPD (o-fenilendiammina) in un prodotto colorato giallo-arancio (Figura 2.12). Andiamo ad effettuare la lettura al Fluostar a 492 nm, valore di assorbanza del substrato. La comparsa di una colorazione giallo-arancio è proporzionale alla quantità di complesso presente in ciascun pozzetto e quindi, a concentrazioni simili, ad una maggiore o minore affinità dell'oligonucleotide per la proteina.

È stata fatta una prova preliminare utilizzando per il lavaggio, a fianco alla soluzione PBS già impiegata, una soluzione di PBS contenente un agente detergente come SDS, sodio dodecil solfato, allo 0,1% e gli esperimenti sono stati svolti in doppio.

Infine si è valutato l'attività delle tre frazioni dell'aptamero, picco 1, picco 2, picco TOT, confrontandola con quella di un oligonucleotide aspecifico e nelle stesse condizioni degli esperimenti precedenti.

2.5 Marcatura degli oligonucleotidi complementari

Il secondo filone del progetto ENCODER è incentrato sulla scelta e caratterizzazione di oligonucleotidi complementari tra loro per la realizzazione di un sistema di distacco termo-foto-indotto e il conseguente rilascio di molecole farmacologicamente attive.

La coppia di oligonucleotidi deve essere caricata sulla nanoparticella e la molecola attiva legata ad uno dei due oligonucleotidi deve essere rilasciata nelle cellule ipertrofiche bersaglio (Figura 2.13).

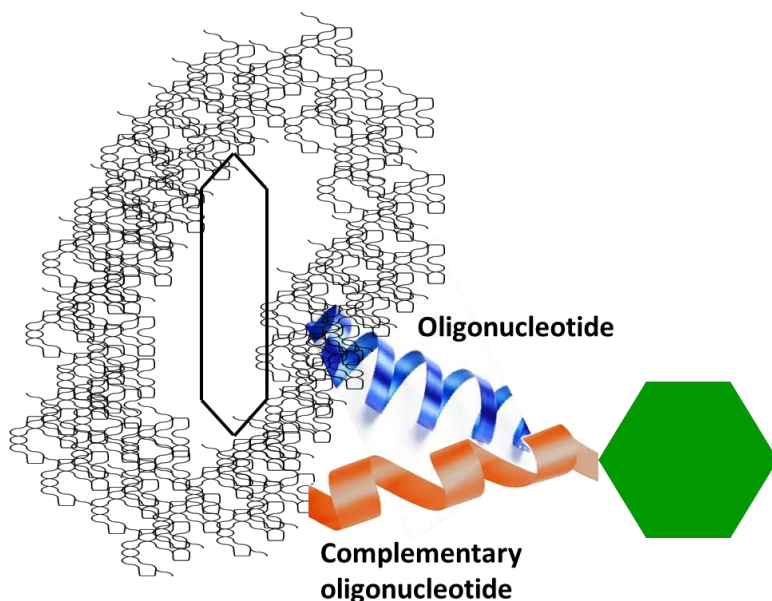


Figura 2.13: Coppia di oligonucleotidi complementari ancorati alla nanoparticella.

Le cellule bersaglio vengono riconosciute dall'aptamero legante l'osteopontina e, in seguito ad una irradiazione delle sonde, queste si separano rilasciando la molecola farmacologicamente attiva nel sito di interesse (Figura 2.14).

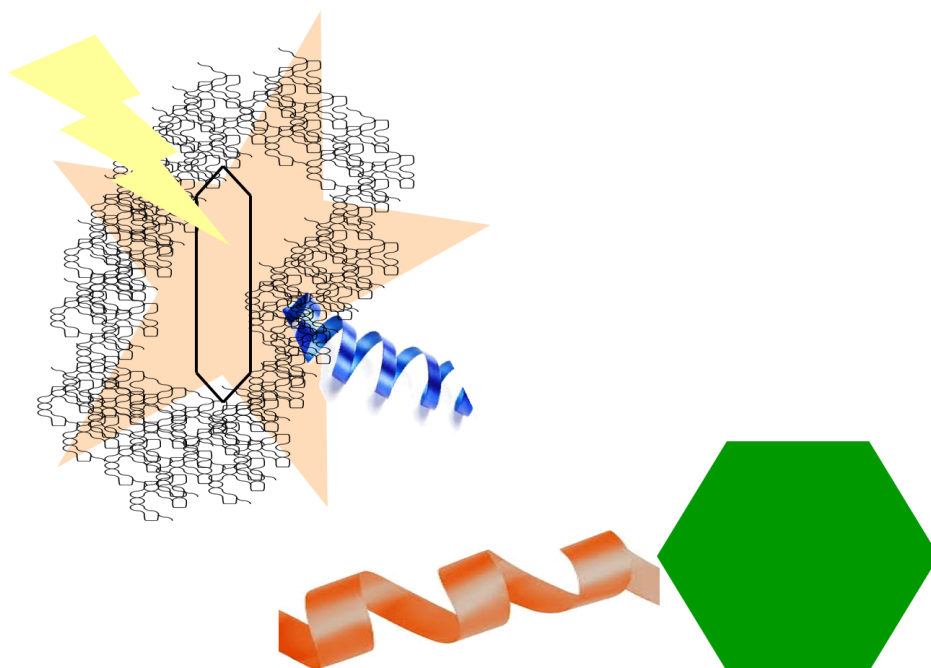


Figura 2.14: Irradiazione delle sonde e conseguente distacco.

Le sequenze degli oligonucleotidi sono state scelte sulla base della loro non-complementarietà con sequenze di RNA messaggero umano e della loro energia di legame che determina specificità e temperatura di dissociazione.

La strategia del progetto prevede di agganciare alla nanoparticella un oligonucleotide detto Probe e l'aptamero. Un secondo passaggio è quello di far ibridare questo oligonucleotide con il suo complementare, il Target, portante un farmaco o un fluorocromo. Lo scopo finale è quello di indirizzare il farmaco o il fluorocromo nei siti dove si trova l'osteopontina, riconosciuta in modo specifico dall'aptamero. A tale scopo sono state studiate modifiche chimiche da fare alle estremità delle sequenze degli oligonucleotidi (Figura 2.15).



Figura 2.15: Modifiche agli oligonucleotidi complementari.

Per legare l'oligonucleotide probe alla nanoparticella dobbiamo inserire una porzione spacer portante un gruppo sulfidrilico SH ed otteniamo tale modifica con il crosslinker SATA (N-Succinimidyil S-Acetylthioacetate).

Sul target complementare andiamo ad introdurre un fluorocromo effettuando una marcatura con il marcatore Cy3TM Mono Reactive. Il fluorocromo introdotto sul target può servire per valutare l'effettiva funzionalizzazione delle nanoparticelle e può essere successivamente accompagnato/sostituito con una molecola farmacologicamente attiva.

Gli oligonucleotidi presentano tali sequenze:

probe scrambled 5'-UCCUCUUCAUACAACACCAAGUACGUUU-3'

target scrambled 5'-AACGUACUUGCUGUUGAUGAAGAGGA-3'

I nucleotidi sono modificati nella posizione 2' del ribosio, presentando un gruppo 2'OMe mentre l'estremità 5' espone un gruppo amminico -NH₂ necessario per l'introduzione di modifiche chimiche sulla molecola.

Gli oligonucleotidi complementari sono stati acquistati dalla *GenePharma, Shanghai*. È stata fatta una quantificazione tramite lettura allo spettrofotometro Fluostar in maniera analoga a quella svolta per quantificare l'aptamero. Dopo i calcoli per risalire alla quantità degli oligonucleotidi che abbiamo, le soluzioni acquose sono state congelate e successivamente liofilizzate per essere conservate a -20° C.

Per modificare chimicamente probe e target, dobbiamo solubilizzarli in un tampone che non contenga gruppi amminici, per esempio scegliamo PBS. Si fanno preliminarmente prove di solubilità per trovare il volume ideale di buffer di reazione, un volume che non sia troppo piccolo in modo tale da permettere la solubilizzazione sia dell'oligonucleotide che del marcatore, ma che non sia troppo grande per favorire l'incontro tra le molecole e quindi la reazione di marcatura.

Una volta scelto il volume di tampone, si lascia incubare la soluzione contenente l'oligonucleotide e il marcatore a 37° C e 700 rpm per un certo tempo.

SATA (N-Succinimidyil S-Acetylthioacetate) è un reagente utilizzato per l'introduzione di gruppi sulfidrilici protetti in proteine, peptidi e altre molecole. È un estere N-idrossisuccinimidico dell'acido S-acetilthioacetico. Dalla reazione dell'estere con ammine primarie si forma un legame covalente ammidico stabile. L'ammina reagisce con l'estere con un attacco nucleofilo ed esce come sottoprodotto N-idrossisuccinimide (Figura 2.16). La deprotezione per generare un SH libero viene fatta con idrossilammina cloridrato (NH₂OH·HCl).

SATA presenta alcuni vantaggi per l'aggiunta di gruppi sulfidrilici:

- Condizioni di reazione blande e non denaturanti. Le reazioni degli esteri NHS possono essere svolte in una varietà di buffer non amminici a pH 7-9 e temperature dai 4 ai 37°C, con tempi di incubazione che vanno da pochi minuti a overnight.
- La reazione è specifica verso ammine primarie.
- I gruppi sulfidrilici vengono introdotti in una forma protetta consentendo alla molecola modificata di essere conservata per tempo indefinito e in seguito trattata con idrossilammina per esporre il gruppo SH labile alle reazioni di coniugazione finale.

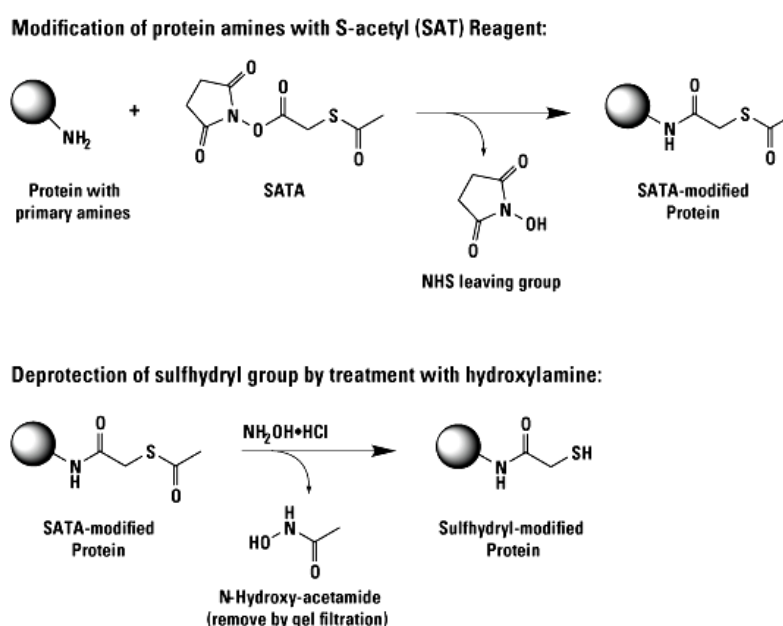


Figura 2.16: Reazione di SATA con una molecola contenente un gruppo amminico e successiva deprotezione del gruppo sulfidrilico.

Dopo il tempo di incubazione, l'oligonucleotide probe presenta il gruppo sulfidrilico protetto con un gruppo acetilico. Si procede quindi al trattamento con la Deacetylation Solution contenente idrossilammina e EDTA per rendere libero il gruppo –SH. Per rimuovere i sottoprodotti delle reazioni e le sostanze non reagite, si effettua una filtrazione delle soluzioni ottenute con filtri 3000 MWCO Microcon Millipore e andiamo a leggere allo spettrofotometro Fluostar l'assorbimento dei vari flow through e retentati.

Per quanto riguarda l'oligonucleotide complementare target, l'introduzione del fluorocromo sull'ammina reattiva prevede il trattamento con il marcatore Cy3™ Mono-Reactive (Amersham Cy3 Mono-Reactive Dye Pack). Cy3 fa parte del gruppo delle cianine e può marcare proteine o oligonucleotidi (Figura 2.17). I reagenti contenenti cianine hanno

dimostrato di essere utili come marcatori fluorescenti per molecole biologiche. Questi coloranti presentano numerosi vantaggi rispetto ad altri fluorofori esistenti in quanto sono altamente solubili in acqua e intensamente fluorescenti. Il colorante Cy3 è una cianina fluorescente di colore arancio che produce un segnale intenso facilmente rilevabile. Quello che noi usiamo è un estere NHS, N-idrossisuccinimidico monofunzionale, in forma essiccata e pre-misurata pronta per la marcatura di composti con gruppi amminici liberi e di norma deve essere conservata a 2-8° C al buio. La soluzione è colorata grazie alla presenza di doppi legami coniugati. Cy3 ha un coefficiente di estinzione molare $150000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, il picco di eccitazione a 550 nm e quello di emissione a 570 nm.

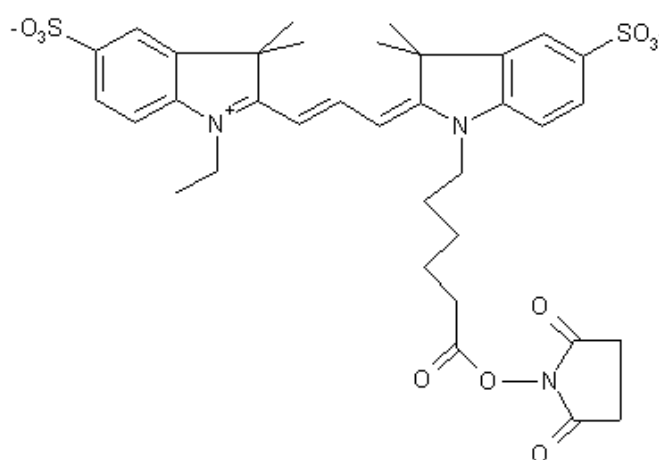


Figura 2.17: Colorante Cy3 monofunzionale.

Dopo il tempo di incubazione della soluzione di target e marcatore in PBS 0.2X, andiamo a filtrare tale soluzione “labeling” con filtri *3000 MWCO Microcon Millipore* per rimuovere i sottoprodotti della reazione e le sostanze che non hanno reagito ed andiamo a leggere allo spettrofotometro Fluostar a 260 e 550 nm, lunghezza d’onda alla quale vediamo il massimo assorbimento del Cy3.

2.6 Valutazione della persistenza nel tempo della fluorescenza del 6-FAM con cui è marcato il target

Nell’ambito della rilevazione di un oligonucleotide tramite fluorescenza, la scelta del marcatore assume una grande importanza. Dal momento che la fluorescenza del marcatore

è sensibile al microambiente che lo circonda, bisogna considerare come quest'ultimo possa modificare le proprietà spettroscopiche del fluoroforo scelto.

Abbiamo acquistato dalla *IDT, Integrated DNA Technologies* probe e target scrambled a DNA opportunamente modificati. L'oligonucleotide target presenta all'estremità 3' una molecola di 6-carbossifluoresceina (6-FAM), uno dei due isomeri della carbossifluoresceina. La 6-carbossifluoresceina è il colorante fluorescente più usato per marcare gli oligonucleotidi perchè è reattivo, solubile in acqua, presenta un assorbimento massimo a 492 nm e un'emissione massima a 517 nm. È stato dimostrato che la molecola FAM diminuisce la sua fluorescenza a pH acido [You et al., *Biopolymers* 2011]. Come la fluoresceina da cui deriva, anche per la carbossifluoresceina sono fluorescenti solo la forma dianionica e quella monoanionica. A pH minori di 7 la molecola è protonata quindi la fluorescenza diminuisce. 6-FAM viene usata infatti nel range di pH 7.5-8.5.

Vogliamo verificare, con l'esperimento che segue, che la fluorescenza di una soluzione tamponata, utilizzando PBS (phosphate buffered saline) a pH 7.4, non si riduca in modo rilevante nel tempo. L'oligonucleotide target marcato con 6-FAM viene solubilizzato in tampone PBS 1X e vengono preparate soluzioni a concentrazione nota. Andiamo a leggere l'assorbanza di tali soluzioni a 260 nm e a 492 nm, lunghezza d'onda alla quale la carbossifluoresceina presenta il suo massimo assorbimento. Sono state effettuate letture al Fluostar a determinati tempi dall'inizio dell'esperimento e riportate in grafico le misure di assorbanza e di emissione di fluorescenza nel tempo.

2.7 Dissociazione termica dei due oligonucleotidi complementari

Per mettere a punto una procedura di attivazione foto-termica delle sequenze, siamo andati a misurare la temperatura di melting del doppio filamento formato dai due oligonucleotidi complementari. I programmi che si trovano su internet per calcolare la temperatura di melting sono pensati per primers da PCR in tipici tamponi come Tris e sono soprattutto per oligonucleotidi a DNA. Le nostre sequenze complementari probe e target sono però anche a RNA e, per mimare le condizioni fisiologiche dell'organismo, sono solubilizzate nel tampone SBF (Simulated/Syntetic Body Fluid). Per questo motivo andiamo a misurare sperimentalmente la temperatura di melting dei nostri duplex e verifichiamo quanto essa si avvicina o si discosta da quella teorica.

Le forze che stabilizzano la doppia elica del DNA sono costituite principalmente dai legami a idrogeno e dalle interazioni di impilamento delle basi. I legami a idrogeno rientrano tra le interazioni di *appaiamento* delle basi. Nei singoli filamenti i gruppi eterociclici delle basi azotate formano una rete complessa di legami idrogeno con le molecole di acqua circostanti. Durante la formazione del duplex, però, alcuni di questi legami devono essere rotti per consentire la realizzazione dei legami idrogeno tra le basi dei due filamenti (<http://www.atdbio.com/content/53/DNA-duplex-stability>). A contribuire maggiormente alla stabilità del duplex sono però le interazioni di *impilamento* delle basi (*stacking interactions*). Con questo termine si intende la disposizione impilata di molecole aromatiche che tendono a disporsi spontaneamente come colonne di monete. Le basi azotate sono infatti molecole con anelli aromatici che, all'interno della doppia elica, vengono a disporsi parallelamente tra loro, facilitando la sovrapposizione degli orbitali p e la conseguente interazione di stacking.

Il riscaldamento del duplex a DNA viene definito *denaturazione* e comporta la separazione delle due catene complementari le quali vanno ad assumere conformazioni casuali nello spazio (Figura 2.18).

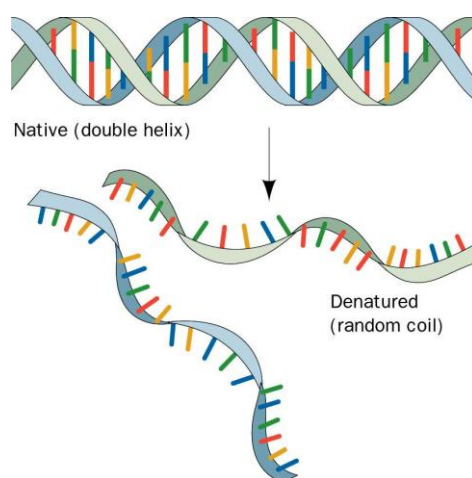


Figura 2.18: Conformazione a doppio filamento e a singolo filamento dopo denaturazione.

Riscaldando la soluzione di DNA, la viscosità diminuisce drasticamente e l'assorbimento nell'UV aumenta di circa il 40% a causa della rottura delle interazioni elettroniche tra basi vicine. Tale aumento di assorbanza viene chiamato "*effetto ipercromico*". L'effetto ipercromico consiste nel singolare aumento di assorbanza del DNA subito dopo denaturazione. È stato infatti osservato sperimentalmente che basi accoppiate ed impilate assorbono meno nell'UV di quelle "separate" (Figura 2.19).

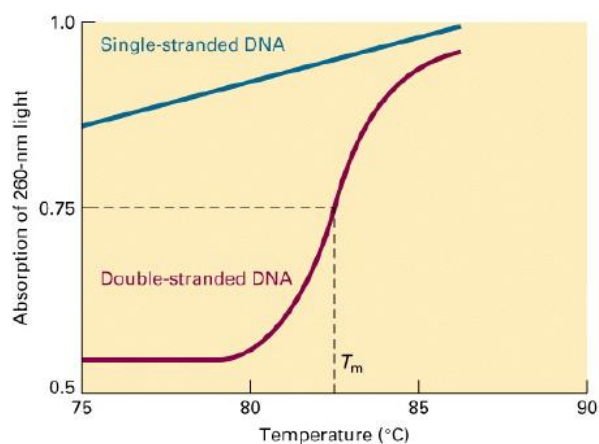


Figura 2.19: Assorbimento del DNA a 260 nm in funzione della temperatura.

La temperatura di melting aumenta linearmente con la concentrazione molare di coppie di basi G•C perché contengono un legame idrogeno in più di A•T (Figura 2.20).

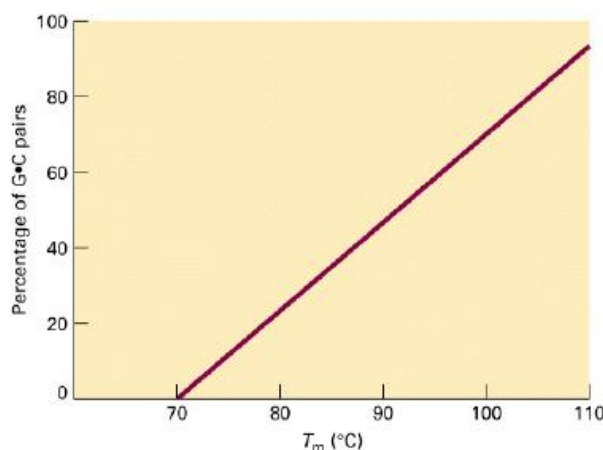


Figura 2.20: Dipendenza della T_m dal contenuto in guanina e citosina.

La temperatura di fusione (T_m , melting temperature) di un duplex oligonucleotidico fa riferimento alla temperatura alla quale l'oligonucleotide si trova al 50% accoppiato al suo complementare. Questo significa che, alla temperatura di fusione, il 50% delle molecole è nella forma a singolo filamento (SS, single-stranded) mentre il restante 50% è nella forma a doppio filamento (DS, double-stranded). Una stima accurata della T_m di un duplex oligonucleotidico probe- target è importante per un'ampia varietà di applicazioni come PCR, ibridazione e sequenziamento.

Comunemente si pensa, in modo errato, che la temperatura di fusione sia influenzata solo dalla sequenza dell'oligonucleotide ma non dalle condizioni sperimentali. In realtà la

temperatura di melting dipende dalla sequenza di basi ma anche dalla concentrazione dell'oligonucleotide e dalla presenza di cationi nel buffer, in modo specifico dalle concentrazioni del sale monovalente Na^+ e del sale bivalente Mg^{++} .

In assenza di agenti destabilizzanti, come urea o formammide, la T_m di un oligonucleotide dipenderà principalmente da tre fattori:

1. Concentrazione dell'oligonucleotide: alte concentrazioni di DNA favoriscono la formazione del duplex che incrementerà la T_m .
2. Concentrazioni saline: Concentrazioni ioniche più elevate del solvente aumenteranno la T_m a causa degli effetti stabilizzanti che i cationi hanno sulla formazione del duplex di DNA. I cationi si legano di più al duplex di DNA che ai singoli filamenti. Cationi diversi possono avere effetti diversi sulla T_m . È stato trovato che sia il Na^+ che il Mg^{++} hanno effetti sulla stabilità del duplex oligonucleotidico.
3. Sequenza dell'oligonucleotide: generalmente sequenze con una frazione più elevata di basi GC hanno una T_m più alta rispetto alle sequenze ricche in AT. Tuttavia la T_m di un oligo non è semplicemente la somma del contenuto di GC e AT. Le interazioni di impilamento tra le basi devono inoltre essere prese in considerazione quindi deve essere conosciuta la reale specifica sequenza per predire in modo accurato la T_m [©2005, 2010 e 2011, Integrated DNA Technologies].

In laboratorio abbiamo utilizzato uno spettrofotometro a doppio raggio per misurare l'assorbanza delle soluzioni (Cary Varian Spectrophotometer UV-vis, Dual cell Peltier accessory).

La spettroscopia ultravioletta-visibile o UV-vis è una tecnica spettroscopica di assorbimento. Quando un fotone ultravioletto o visibile viene assorbito da una molecola, questa passa dal suo stato elettronico fondamentale ad uno stato elettronico eccitato.

In un tipico spettro ultravioletto/visibile in ascissa viene riportata la lunghezza d'onda e in ordinata la percentuale di trasmittanza o di assorbanza. Se un materiale non è completamente trasparente si verificheranno degli assorbimenti e quindi delle transizioni tra livelli energetici elettronici.

Quando un fotone possiede energia sufficiente affinché avvenga una transizione elettronica, si verifica un assorbimento che entro un certo intervallo di concentrazioni e in presenza di radiazione monocromatica segue la legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon_{\lambda} \ell C;$$

dove ε_λ rappresenta il coefficiente di assorbimento molare, C è la concentrazione molare della soluzione e l è il cammino ottico costituito dallo spessore di campione attraversato dal raggio luminoso. Il caratteristico assorbimento presentato da diversi tipi di sostanze dipende dalla presenza di determinati cromofori.

Uno spettrofotometro UV- vis è costituito da (Figura 2.21):

- Una sorgente, la lampada, che fornisce le varie lunghezze d'onda
- Un monocromatore che consente di selezionare una lunghezza d'onda di interesse
- Il campione in soluzione nella cuvetta (la quale deve essere trasparente alla lunghezza d'onda alla quale si lavora)
- Un rivelatore.

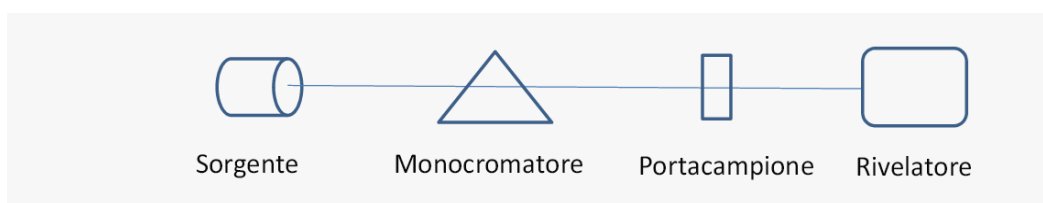


Figura 2.21: Componenti di uno spettrofotometro UV/vis.

Noi utilizziamo un sistema a doppio raggio in cui un raggio attraversa la soluzione di riferimento e un raggio il campione, in seguito viene fatta la sottrazione tra i due valori. Le cuvette sono parallelepipedi, nel nostro caso di quarzo perché lavoriamo nell'ultravioletto. Andiamo a leggere a 260 nm, lunghezza d'onda alla quale si osservano gli assorbimenti tipici del DNA. Il cammino ottico è 1 cm quindi secondo la legge di Lambert-Beer l'assorbanza dipende dalla concentrazione e dal coefficiente di estinzione molare. Per mimare le condizioni fisiologiche dell'organismo abbiamo usato come solvente SBF (Simulated/Syntetic Body Fluid) 1X con concentrazioni di Na^+ 142 mM e Mg^{++} 1.5 mM. Oltre allo spettrofotometro, viene utilizzata anche una resistenza che, scaldando le cuvette e quindi le soluzioni, permette di effettuare la rampa di temperatura desiderata. La rampa di temperatura include la temperatura di melting prevista per l'oligonucleotide dal sito Oligo Analyzer della IDT (Integrated DNA Technologies). Oligo Analyzer è un sito studiato per ricavare informazioni su oligonucleotidi che possono essere primers di PCR, come conoscere il loro coefficiente di estinzione, il peso molecolare e la temperatura di melting. È possibile, infatti, inserendo la concentrazione dell'oligonucleotide, la sua sequenza e le concentrazioni di Na^+ e Mg^{++} di un tipico tampone da PCR come può essere Tris, ottenere

la temperatura di melting prevista per il duplex grazie a calcoli e considerazioni termodinamiche. Dal momento che per mimare le condizioni fisiologiche dell'organismo usiamo come solvente SBF e non Tris, andiamo a verificare in laboratorio se la temperatura di melting ottenuta sperimentalmente corrisponde a quella teorica. Immettendo la sequenza dell'oligonucleotide probe o del target, la concentrazione 1,5 uM e le concentrazioni dei sali, otteniamo come temperatura di melting prevista per il duplex 68,9° C (Figura 2.22). Verifichiamo sperimentalmente se questa temperatura corrisponde a quella che otteniamo nelle nostre condizioni in laboratorio, solubilizzando probe e target in tampone SBF 1X alla concentrazione 1,5 uM ed effettuando una rampa di temperatura che include 68,9° C.

OligoAnalyzer 3.1

Instructions | Definitions | Feedback

Sequence # Bases 26

5'-AAC GTA CTT CGT GTT GAT GAA GAG GA -3'

Target Type DNA

Oligo Conc 1.5 μ M

Na⁺ Conc 142 mM

Mg⁺⁺ Conc 1.5 mM

dNTPs Conc 0 mM

Clear Sequence Add To Order Default Settings

Results	5' mods	Internal Mods	3' mods	Mixed Bases
RESULTS SEQUENCE: 5'- AAC GTA CTT CGT GTT GAT GAA GAG GA -3' COMPLEMENT: 5'- TCC TCT TCA TCA ACA CGA AGT ACG TT -3' LENGTH: 26 GC CONTENT: 42.3 % MELT TEMP: 68.9 °C MOLECULAR WEIGHT: 8074.3 g/mole EXTINCTION COEFFICIENT: 266300 L/(mole·cm) nmole/OD₂₆₀: 3.76 μg/OD₂₆₀: 30.32				

Figura 2.22: La temperatura di melting prevista da Oligo Analyzer per il duplex immettendo la sequenza del target, alla concentrazione 1,5 uM e sciolto in un tampone contenente [Na⁺] 142 mM e [Mg⁺⁺] 1,5 mM, è 68,9 °C.

Siamo andati anche a valutare la temperatura di melting dell'ibrido formato dai due oligonucleotidi Probe e Target che presentano una modifica nella posizione 2' dello zucchero. I due oligonucleotidi modificati sono 2'OMe cioè presentano un ossigeno che lega un gruppo alchilico. Abbiamo comparato la loro temperatura di melting con quella dei corrispondenti deossiribonucleotidi (DNA) confermando la tesi di una loro maggiore stabilità e quindi di una T melting più alta. Infatti *Freier et al.* [Freier et al., Nucleic Acid

Research 1997] hanno riportato che, in generale, modifiche che risultano in duplex più stabili contengono un eteroatomo nella posizione 2' dello zucchero.

Come riportato da www.trilinkbiotech.com, la termostabilità di duplex con nucleotidi modificati è:

meno stabile >> aumento della T_m >> più stabile

DNA:DNA < DNA:RNA < RNA:RNA < RNA: 2'OMe RNA

In particolare *Freier et al.* hanno dimostrato che una sostituzione con un gruppo 2'-O-alchilico stabilizza il duplex e che sostituenti piccoli conferiscono una maggiore stabilità rispetto a quelli più grandi. L'aumento di stabilità attribuito al 2'OMe si pensa sia dovuto alla tendenza di questi sostituenti elettronegativi di spostare l'equilibrio conformazionale dello zucchero verso la conformazione C3'-*endo*, che sembra favorire l'ibridazione. Dall'altro lato la destabilizzazione causata da sostituenti più grandi del 2'-O-alchile può essere dovuta ad un ingombro sterico delle catene alchiliche con altre parti del duplex [Freier et al., Nucleic Acid Research 1997].

La temperatura di melting prevista per il duplex formato dagli oligonucleotidi 2'OMe è 77,39° C ed è stata ricavata su <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html> inserendo la sequenza e la concentrazione del target, la concentrazione dei sali in SBF e selezionando "ssRNA" come molecola (Figura 2.23).

Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator

Enter Oligonucleotide Sequence Below
OD calculations are for single-stranded DNA or RNA

[Nucleotide base codes](#)

TCC TCT TCA TCA ACA CGA AGT ACG TT

Reverse Complement Strand(5' to 3') is:

AAC GUA CUU CGU GUU GAU GAA GAG GA

[5' modification](#) (if any)

[3' modification](#) (if any)

Select molecule

nM Primer
 mM Salt (Na⁺)

Measured Absorbance at 260 nanometers

Calculate
Swap Strands
BLAST
mfold

Physical Constants			Melting Temperature (T _M) Calculations	
Length: <input type="text" value="26"/>	Molecular Weight: <input type="text" value="8502.1"/>	GC content: <input type="text" value="42"/> %	1 <input type="text" value="56.4"/> °C (Basic)	
1 ml of a sol'n with an Absorbance of <input type="text" value="1"/> at 260 nm			2 <input type="text" value="59.2"/> °C (Salt Adjusted)	
is <input type="text" value="3.377"/> microMolar 5 and contains <input type="text" value="28.7"/> micrograms.			3 <input type="text" value="77.39"/> °C (Nearest Neighbor)	
Thermodynamic Constants Conditions: 1 M NaCl at 25°C at pH 7.				
RlnK <input type="text" value="25.406"/>	cal/(°K*mol)	deltaH <input type="text" value="260.9"/>	Kcal/mol	
deltaG <input type="text" value="33.9"/>	Kcal/mol	deltaS <input type="text" value="681.3"/>	cal/(°K*mol)	

Figura 2.23: Calcolatore della temperatura di melting del duplex 2'OMe.

2.8 Elettroforesi Capillare

L'elettroforesi, definita in modo operativo come la migrazione di analiti in una soluzione elettrolita sotto l'influenza di un campo elettrico, è stata per la prima volta descritta da Tiselius negli anni '30. Dal momento della sua introduzione, l'elettroforesi è diventata uno strumento primario per la separazione biochimica ed ha dato origine a numerose varianti.

Una di queste varianti, l'elettroforesi capillare, si sviluppò negli anni '60 come tecnica per cercare di risolvere le ambiguità del processo elettroforetico stesso [©2005, 2010, and 2011 Integrated DNA Technologies].

L'elettroforesi capillare è una tecnica di separazione relativamente nuova e potente che si adatta perfettamente ad utilizzare piccole quantità di campione.

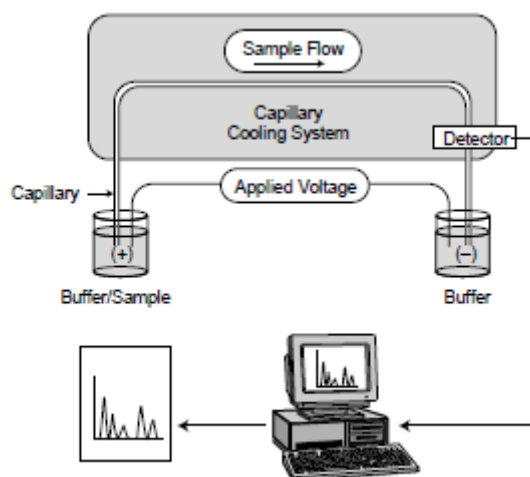


Figura 2.24: Diagramma di uno strumento CE a polarità normale (anodo al sito di iniezione).

La Figura 2.24 mostra un diagramma schematico di un sistema CE come quello usato nel P/ACETM MDQ della Beckman. Come canali di separazione vengono usati capillari di silice fusa, generalmente con diametro interno i.d. 20-100 µm e lunghezza 20-100 cm. I capillari hanno una superficie interna che può essere nuda oppure rivestita, a seconda dell'applicazione, e sono alloggiati in un cartridge a temperatura controllata. Le estremità del capillare sono posizionate nelle vials del campione e/o buffer. Nel P/ACE l'introduzione del campione avviene per pressione o per via elettrocinetica. Nel metodo per pressione, la vial del campione è temporaneamente pressurizzata per consentire il flusso del campione nel capillare; il metodo elettrocinetico utilizza il campo elettrico per trasportare analiti carichi nel capillare.

Rispetto all'elettroforesi tradizionale su gel, l'elettroforesi capillare può trarre vantaggio da due tipi di forze: 1) la forza che causa la migrazione elettroforetica e 2) la forza esercitata dal flusso elettroosmotico (EOF) attraverso il capillare.

Il flusso elettroosmotico è causato dal fatto che la superficie interna del capillare è carica durante l'applicazione di un campo elettrico. Con capillari di silice fusa non trattati e un tampone acquoso, la superficie del capillare è caricata negativamente (Figura 2.25). La grandezza di questo flusso dipende da vari fattori sperimentali, in particolare dal pH della soluzione buffer.

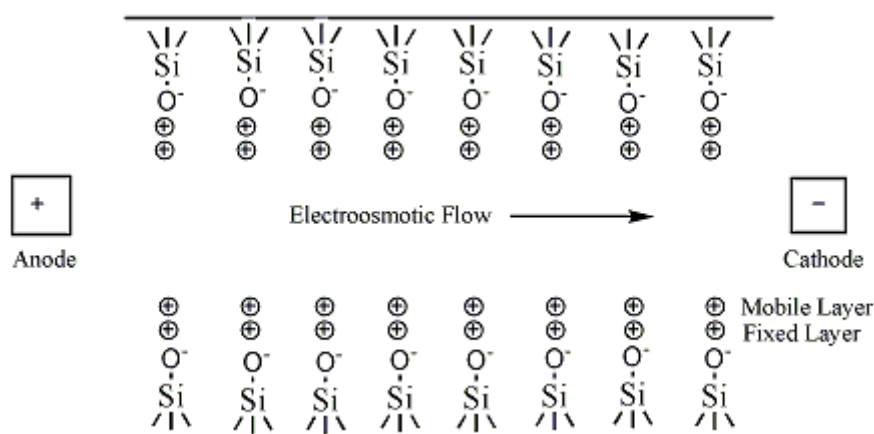


Figura 2.25: Rappresentazione della superficie interna di un capillare in silice fusa non trattato.

A causa del flusso elettroosmotico, tutti i componenti del campione migrano verso l'elettrodo negativo. La superficie del capillare di silice, infatti, contiene gruppi funzionali carichi negativamente che attraggono ioni positivi. Gli ioni positivi migrano verso l'elettrodo negativo e trascinano con sé anche molecole di solvente. Questo flusso di solvente viene chiamato "effetto elettroosmotico". Durante la separazione, molecole non cariche si muovono alla stessa velocità del flusso elettroosmotico (con scarsa separazione). Gli ioni positivi si muovono più velocemente e quelli negativi più lentamente.

Il rivestimento dei capillari può invertire, ridurre o eliminare totalmente tale flusso. L'ultimo è il caso dei gel, in cui oligonucleotidi sintetici o frammenti di restrizione a DNA sono separati mediante l'elettroforesi capillare su gel, CGE.

I più moderni strumenti CE consentono voltaggi fino a 30 kV durante le corse, che sono di solito molto più alti rispetto a quelli usati nella elettroforesi tradizionale su gel. Questo spiega in parte l'alta risoluzione e i veloci tempi di analisi delle separazioni in CE.

Il riscaldamento risultante nel capillare viene efficacemente dissipato attraverso le pareti dal circostante liquido refrigerante.

In CE si possono distinguere due tipi di matrici semisolide: 1) un gel crosslinked ad alta viscosità che è chimicamente ancorato alla parete del capillare (“gel chimico”), e 2) una soluzione polimerica a bassa viscosità (“gel fisico”). Con entrambi i tipi di gel, i capillari pre-rivestiti vengono usati per eliminare il flusso elettrosmotico.

Caratteristiche dei gel fisici:

- Non crosslinked e non si attaccano alla parete del capillare
- Rete di polimeri idrofili lineari o ramificati
- Struttura dinamica dei pori
- Le dimensioni dei pori possono essere cambiate
- Insensibili al calore
- Le particelle possono essere facilmente rimosse
- Quando si utilizza una matrice a bassa viscosità il gel può essere sostituito, per esempio eCAP dsDNA 1000.

Un vantaggio importante dei gel fisici è che si può selezionare una viscosità sufficientemente bassa in modo tale che il contenuto del capillare possa essere trasportato via e, quando si desidera, si può usare gel fresco per ogni nuova iniezione di campione. Inoltre l'introduzione del campione è possibile sia attraverso il metodo per pressione che quello elettrocinetico, diversamente da quando usiamo gel chimici che richiedono solo l'uso del metodo elettrocinetico [Schwartz and Guttman, Beckman Coulter].

Per stimare la mobilità in CE dei nostri oligonucleotidi, utilizziamo capillari rivestiti e riempiti con matrici semisolide in particolare usiamo un gel di poliacrilamide lineare a bassa viscosità, presente in forma liofilizzata nel kit della Beckman dsDNA 1000. Il kit contiene gli elementi necessari a svolgere separazioni e analisi di frammenti di DNA a doppio filamento che vanno dalle 100 alle 1000 bp. Il kit contiene anche due capillari rivestiti di lunghezza 65 cm e diametro interno I.D. 100 µm. Il gel buffer liofilizzato va reidratato prima dell'uso con acqua ionizzata, filtrato per rimuovere le piccole particelle intrappolate e sonicato per eliminare le bolle di aria. In tali condizioni impieghiamo un detector UV con un filtro a 254 nm. L'elettroferogramma in CE è un grafico del tempo dall'iniezione sull'asse x e del segnale del detector (assorbanza) sull'asse y.

Abbiamo fatto corse di aptamero e osteopontina in SBF 1X separatamente e in miscela introducendo i campioni tramite metodo elettrocinetico cioè l'iniezione avviene applicando nella vial di ingresso un determinato voltaggio per un certo tempo.

Il punto isoelettrico dell'osteopontina, ottenuto inserendo la sequenza amminoacidica della proteina nel sito <http://isoelectric.ovh.org/>, è circa 4 quindi a pH fisiologico, come quello del tampone SBF utilizzato, dovrebbe presentare cariche negative e quindi muoversi verso l'elettrodo positivo all'uscita del capillare.

Gli aptameri oligonucleotidici sono polianioni con una mobilità elettroforetica caratteristica fortemente negativa. Le proteine target di solito possiedono una carica più piccola e minore mobilità. Il complesso aptamero-proteina possiede una mobilità elettroforetica intermedia tra quella dell'aptamero e del target, rendendo la separazione del complesso dall'aptamero libero diretta [M. Jing, M.T. Bowser, Anal. Chim. Acta 2011].

Per isolare e caratterizzare il comportamento del solo tampone, abbiamo fatto correre anche SBF 1X nelle stesse condizioni degli oligonucleotidi.

Abbiamo valutato la mobilità in CE anche degli oligonucleotidi complementari singolarmente ed insieme in miscela. Abbiamo modificato il tempo di iniezione di un composto e lasciato inalterato l'altro per osservare l'aumento e la diminuzione di assorbanza dei componenti.

3 Materiali e Metodi

3.1 Sintesi chimica dell'aptamero

Gli oligonucleotidi sono stati sintetizzati con un sistema automatico che usa la chimica delle fosforamiditi. L'apparecchio usato è un “3400 DNA-Synthesizer” (*Applied Biosystems*), che lavora sotto pressione di argon ed in ambiente anidro.

Le fosforoamiditi sono forniti dall'azienda produttrice (*Glen Research*) in polvere. Di norma devono essere conservati in essiccatore a 4°C ed in atmosfera di Ar. Le polveri vengono sciolte in opportuni volumi di acetonitrile anidro (*Applied Biosystems*).

I reagenti usati per l'esecuzione automatica della sintesi sono contenuti in bottiglie di vetro scuro compatibili con lo strumento. Le bottiglie vengono alloggiare nello strumento con procedure che riducono al minimo la possibilità di contatto con l'umidità atmosferica. Le soluzioni utilizzate sono:

- Deblock (*Applied Biosystems*), costituito da acido tricloroacetico al 3% in diclorometano anidro
- Acetonitrile anidro (*Applied Biosystems*), utilizzato per i lavaggi delle linee di dispensazione dei reagenti
- Activator (*Applied Biosystems*), costituito da una soluzione 0.5 M di tetrazolo in acetonitrile anidro
- CAP A (*Applied Biosystems*), costituito da una soluzione al 40% V/V di anidride acetica in tetraidrofurano anidro
- CAP B (*Applied Biosystems*), consistente in una miscela contenente il 10 % in volume di N-metilimidazolo, l'80% di tetraidrofurano , il 10% di piridina
- Oxider (*Applied Biosystems*), contenente una soluzione 0.02 M di iodio disciolto in una miscela costituita dal 78% tetraidrofurano, il 20% piridina, il 2 % acqua.

Sul computer sono stati caricati e memorizzati la sequenza oligonucleotidica dell'aptamero ed i protocolli di esecuzione della reazione di sintesi.

È stata inserita nell'apposito alloggiamento la colonna contenente il vetro a porosità controllata (1000 Å) che espone sulla sua superficie una 1 µmol del 1° nucleotide della sequenza desiderata.

La sequenza dell'aptamero è

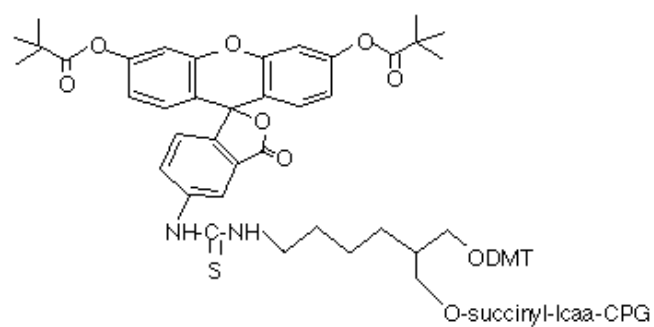
5'- CGGCCACAGAAUGAAAAACCUCAUCGAUGUUGCAUAGUUG-3'

e presenta le seguenti caratteristiche:

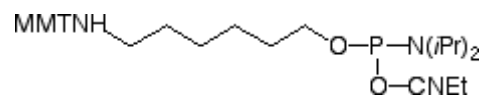
- ✓ A e G ribo
- ✓ 2' OMe C e U
- ✓ Amino-modifier C6 in 5'
- ✓ Colonnina 3' FITC

Come monomeri utilizziamo le fosforamiditi della Glen Research protette con gruppi β -cianoetilici come 3' Fluorescein CPG (a), 5'Amino Modifier C6 (b), 2'OMe-C-CE Phosphoramidite (c), 2'OMe-U-CE Phosphoramidite (d), Ac-G-CE Phosphoramidite (e), Bz-A-CE Phosphoramidite (f), (Figura 3.1).

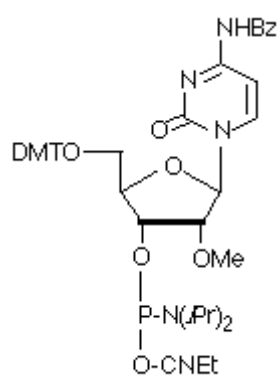
Una volta effettuata la sintesi, andiamo a distaccare l'oligonucleotide a RNA dal supporto su cui è stato sintetizzato e successivamente a deproteggerlo e purificarlo.



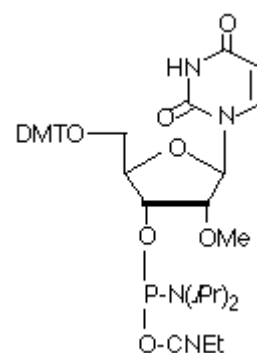
(a)



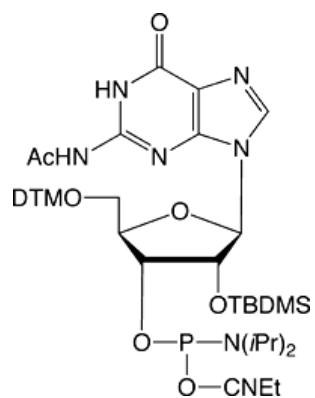
(b)



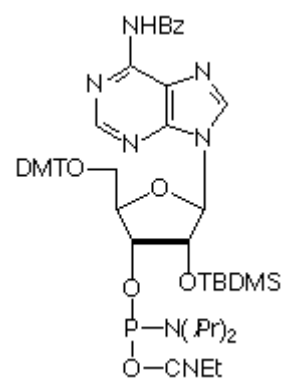
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 3.1: Fosforoamiditi usate nella sintesi a RNA.

3.2 Purificazione RNA

- Usiamo una soluzione di dietilammina (DEA) in acetonitrile al 10 % per lavare la colonnina di vetro, rimuovere i gruppi cianoetilici ed evitare successive reazioni di cianoetilazione.
- Trattamento con solo acetonitrile.
- Effettuiamo la deprotezione con una soluzione di NH_4OH in EtOH (3:1). Mettiamo a bagnomaria a 55° C e lasciamo overnight.
- Dopo aver separato la soluzione contenente l'oligonucleotide dal supporto in vetro, degassiamo la soluzione con azoto (N_2) per eliminare ammoniacca e etanolo.
- Deprotezione a 55° C sotto cappa con TEA·3HF/DMF (triethylammina triidrofluoruro in dimetilformammide) 3:1 per 3 ore.
- Aggiungo 1, 9 mL di RNA Precipitation Mix e lascio a -20° C.
- Distribuisco la soluzione in 4 vials e centrifugo il campione a 13000 rpm, a 4° C per 30 minuti.
- Rimuovo il sovrnatante e lavo il precipitato con EtOH al 70% per eliminare i sali.
- Aspiro il sovrnatante.
- Solubilizzo il solido in acqua e centrifugo la soluzione a 13000 rpm a 18°C per 30 minuti, usando filtri *3000 MWCO Microcon (Millipore)* con cut-off 3000 Da che trattengono l'oligonucleotide e permettono l'eluizione delle specie più piccole.
- Raccolgo la soluzione passata dal filtro come FT “flow through” e quella sul filtro (l'oligonucleotide), girando i filtri in nuove vials ed effettuando un breve spin, come RET “retentato”.

Andiamo ad analizzare in cromatografia liquida HPLC i campioni FT e RET per verificare che la filtrazione abbia eliminato le piccole molecole e le piccole sequenze (cortameri) che si sono prodotte durante la sintesi.

3.2.1 Cromatografia liquida ad Elevata Prestazione, HPLC

Lo strumento è un HPLC *Dionex Ultimate 3000* (con software *Chromeleon*). La soluzione di interesse, il campione, viene iniettato attraverso un autocampionatore e separato in colonna nelle singole frazioni. La colonna è una PA200 *Dionex*, una colonna a scambio anionico forte, costituita di una matrice polimerica funzionalizzata con sali d'ammonio quaternari. Gli eluenti usati in questa HPLC sono:

Eluente A: contiene TRIS (*Fluka*) 20 mM, NaClO₄ (*Sigma*) 1 M ed acetonitrile al 10%

Eluente B: contiene TRIS (*Fluka*) 20 mM ed acetonitrile al 10%

Entrambe le soluzioni vengono filtrate con una membrana da microfiltrazione in nitrocellulosa *Millipore* (cut-off 0,22 µm) e sterilizzate in autoclave.

3.2.2 Cromatografia di esclusione molecolare

Per allontanare i sali, facciamo passare le soluzioni attraverso una colonna *Sephadex G-25* formata da polimeri di destrano. Introduciamo il campione con una siringa sterile in colonna (2° mm diametro, 150 mm lunghezza) e per gravità si fa fluire acqua deionizzata sterile. Raccogliamo la soluzione in uscita in una falcon quando aumentano i valori di assorbanza registrati da un detector e finiamo di raccogliere quando si riportano ai valori di base. Il passaggio dei sali viene segnalato dall'accensione di una spia rossa di un conduttimetro posto nel tubicino in prossimità dell'uscita. Il campione viene molto diluito e ciò richiede una riduzione di volume tramite il *Rotavapor® R II Buchi*. Una volta ridotte di volume le soluzioni, le portiamo a -20° C, congeliamo in azoto liquido e andiamo a liofilizzarle.

3.3 Lettura allo spettrofotometro Fluostar

È stata fatta una lettura di assorbanza a 260 nm con lo spettrofotometro Fluostar (Figura 3.2) in modo da risalire alla quantità di campione che abbiamo ottenuto dalla sintesi e dalla successiva purificazione. Il campione liofilizzato è stato solubilizzato in acqua per ottenere

200 ul di soluzione di concentrazione nota che è stata caricata nei pozzetti di una piastra *costar UV plate, 96 well, with UV transparent flat bottom, acrylic* per la lettura all'UV. Come valore di controllo (bianco) abbiamo utilizzato 200 ul di acqua. I valori di assorbanza dei campioni sono stati sottratti del valore di assorbanza del bianco.



Figura 3.2: FLUOstar Omega.

Il valore di assorbanza rilevato al Fluostar differisce rispetto a quello di un comune spettrofotometro in quanto il cammino ottico non è 1 cm. Possiamo tuttavia ricondurlo a questo utilizzando l'equazione $\text{Abs spettrofotometro} = 1,775 * \text{Abs Fluostar} + 0,02$.

Da questa equazione (ricavata sperimentalmente utilizzando soluzioni di oligonucleotidi a concentrazione nota misurate al Fluostar e in uno spettrofotometro tradizionale, utilizzando una cuvetta standard con cammino ottico di 1 cm) si possono ricavare i valori di assorbanza e successivamente risalire alle concentrazioni dei campioni caricati tramite l'equazione:

$$\text{Concentrazione [uM]} = (\text{Abs spettrofotometro} / \epsilon [\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}]) * 1000$$

Nel nostro caso ϵ , coefficiente di estinzione molare del campione, è $399,9 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ e lo abbiamo ricavato dal programma Oligo Calculation Tool su http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/primer_calculation inserendo la sequenza dell'oligonucleotide. Una volta risaliti alla concentrazione della soluzione UV, moltiplichiamo questa concentrazione per un fattore di diluizione 10 ed otteniamo la concentrazione dell'oligonucleotide nella soluzione concentrata (uM). Conoscendo il volume della soluzione stock, calcoliamo quante nanomoli di oligonucleotide erano presenti nella soluzione concentrata.

3.4 Saggi di affinità ELISA/ELONA

Il test ELISA/ELONA viene effettuato all'interno di piastre da 96 wells funzionalizzate con gruppi NHS (*costar DNA-BIND[®] Amine Binding, N-Oxysuccinimide Surface*) ai quali si lega in modo covalente la proteina OPN e la BSA.

Il test ELISA/ELONA da noi scelto prevede l'utilizzo di tre anticorpi:

Anticorpo primario:

- Monoclonale mouse anti-FITC (MA5-14696, Thermo), utilizzato 1:1000 in PBS

Anticorpo primario verso l'OPN:

- Monoclonale verso OPN, N-terminal (M66102M, Meridian Life Science) alla concentrazione 100 ng/ml

Anticorpo secondario:

- Rabbit anti-Mouse coniugato ad HRP, Thermo Scientific, utilizzato 1:1000 in PBS

Substrato anticorpo secondario:

- OPD (o-fenilendiammina), Thermo Scientific
- H₂O₂
- Stable Peroxide Buffer, Thermo Scientific

Tampone carbonato:

- NH₄HCO₃ 20 mM pH 8.07 1X

Il test ELISA/ELONA inizia funzionalizzando metà della piastra con la proteina BSA e metà con la proteina OPN.

L'albumina viene preparata con una concentrazione del 3% in tampone carbonato.

I passaggi per la funzionalizzazione della piastra sono i seguenti:

- In ogni pozzetto si inseriscono 50 ul di albumina al 3% o 50 ul di soluzione di osteopontina 100 ng/ml in tampone carbonato e si incuba la piastra a 37° C per 1 ora a 350 rpm
- Nei pozzetti dove abbiamo introdotto OPN si aspira il contenuto e si aggiunge 50 ul di PBS 1X per tre volte
- Sempre in tali pozzetti si aggiunge 50 ul di BSA al 3% e la piastra viene nuovamente incubata a 37°C e 350 rpm per 15 minuti

- Trascorso il tempo, si rimuove l'albumina da tutti i pozzetti e si fanno 3 lavaggi con PBS 1X.

Si preparano le diluizioni degli oligonucleotidici in SBF 1X cioè dell'aptamero e di un oligonucleotide aspecifico IDT2090 marcato con fluoresceina che serve come controllo negativo. Dell'aptamero si preparano due concentrazioni, una Low 0.01 uM e una High 0.1 uM, mentre IDT2090 viene portato alla concentrazione 0.1 uM.

Dalla *titration curve* del certificato di analisi dell'anticorpo per OPN si vede che una concentrazione di anticorpo di 100 ng/ml dà un forte segnale quindi scegliamo questa concentrazione in PBS 1X (Figura 3.3).

Gli anticorpi primario e secondario vengono preparati 1:1000 in PBS 1X. Si considera un volume per pozzetto di 50 ul.

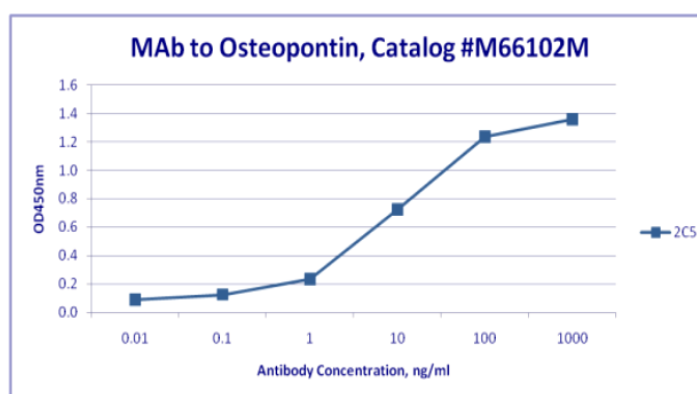


Figura 3.3: Curva di titolazione di M66102M in saggio ELISA indiretto. Antigene: Osteopontina ricombinante full-length che ricopre la piastra alla concentrazione di 0.1 ug/ml. Anticorpo: Diluizioni seriali di M66102M incubate 2 ore a temperatura ambiente, seguite da IgG di capra anti-topo: HRP coniugato e substrato TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine).

- Aggiungo nei pozzetti che lo richiedono 50 ul di aptamero ad alta concentrazione, aptamero a bassa concentrazione o di oligonucleotide aspecifico, tutti in SBF 1X
- Incubo la piastra per 20 minuti a 37° C e 350 rpm
- Lavo con PBS 1X per tre volte
- Aspiro il contenuto e aggiungo 50 ul di soluzione di anticorpo primario o verso OPN, in seguito si incuba la piastra nelle stesse condizioni per 30 minuti
- Dopo l'incubazione del primario, lavo i pozzetti interessati con PBS 1X per tre volte

- Si aggiungono 50 ul di anticorpo secondario nei pozzetti che lo richiedono e si lascia incubare la piastra per 30 minuti a 37° C e 350 rpm
- Lavo i pozzetti con PBS 1X per tre volte
- Terminato questo passaggio, subito prima di effettuare la lettura, si aggiungono 100 ul di substrato dell'enzima legato all'anticorpo secondario e si effettuano le letture di assorbanza a 492 nm. Si effettuano letture a 8 tempi diversi a distanza di 5 minuti una dall'altra.

La lettura di assorbanza viene eseguita a 492 nm, valore di assorbanza del substrato, al Fluostar Omega, uno spettrofotometro che legge la fluorescenza su piastra.

Abbiamo fatto nelle stesse condizioni la prova utilizzando anche PBS in presenza di SDS, sodio dodecil solfato, allo 0,1% seguendo questo protocollo:

- Aggiungo nei pozzetti che lo richiedono 50 ul di aptamero ad alta concentrazione, aptamero a bassa concentrazione o di oligonucleotide aspecifico, tutti in SBF 1X
- Incubo la piastra per 20 minuti a 37° C e 350 rpm
- Lavo per tre volte con PBS 1X i pozzetti che lo richiedono, gli altri pozzetti con PBS + SDS 0,1%
- Aspiro il contenuto e aggiungo 50 ul di soluzione di anticorpo primario o verso OPN, in seguito si incuba la piastra nelle stesse condizioni per 30 minuti
- Dopo l'incubazione del primario, lavo per tre volte i pozzetti con PBS 1X o PBS + SDS 0,1%
- Si aggiungono 50 ul di anticorpo secondario nei pozzetti che lo richiedono e si lascia incubare la piastra per 30 minuti a 37° C e 350 rpm
- Lavo per tre volte i pozzetti con PBS 1X o PBS + SDS 0,1%
- Terminato questo passaggio, subito prima di effettuare la lettura, si aggiungono 100 ul di substrato dell'enzima legato all'anticorpo secondario e si effettuano le letture di assorbanza a 492 nm.

Infine si è valutato l'attività delle tre frazioni dell'aptamero, picco 1, picco 2, picco TOT, confrontandola con quella di un oligonucleotide aspecifico e nelle stesse condizioni degli esperimenti precedenti. Tutti gli oligonucleotidi sono ad alta concentrazione cioè 0,1 uM in tampone SBF.

3.5 Marcatura degli oligonucleotidi complementari

Gli oligonucleotidi complementari acquistati dalla *GenePharma, Shanghai* presentano tali sequenze:

Probe scrambled 5'-UCCUCUUCAUCAACACCAAGUACGUUU-3'

Target scrambled 5'-AACGUACUUGCUGUUGAUGAAGAGGA-3'

I nucleotidi sono modificati nella posizione 2' del ribosio, presentando un gruppo 2'OMe mentre l'estremità 5' espone un gruppo amminico primario alifatico $-NH_2$ necessario per l'introduzione di modifiche chimiche sulla molecola.

È stata fatta una quantificazione tramite lettura allo spettrofotometro Fluostar in modo analogo a quella svolta per quantificare l'aptamero diretto verso l'osteopontina: i dati di assorbanza delle soluzioni degli oligonucleotidi a 260 nm sono stati sottratti del bianco, è stata calcolata l'assorbanza standard, tramite la formula e conoscendo epsilon per ogni oligonucleotide si è risaliti alle concentrazioni delle soluzioni UV e quest'ultima è stata moltiplicata per il fattore di diluizione per ottenere la concentrazione della soluzione stock. Dopo i calcoli per risalire alla quantità degli oligonucleotidi, le soluzioni acquose sono state congelate e successivamente liofilizzate per essere conservate a $-20^\circ C$.

3.5.1 Modifica del probe scrambled per l'esposizione di un gruppo sulfidrilico -SH

Dopo aver effettuato preliminarmente prove di solubilità del crosslinker nel nostro tampone, aggiungiamo 5 ul di soluzione 20 mM di SATA (Thermo Scientific) in DMF anidra a 35 ul di PBS 0.2X. Abbiamo aggiunto 2 nmoli di probe e messo a incubare a $37^\circ C$ e 700 rpm per 2 ore per far avvenire la reazione di labeling.

Il gruppo SH introdotto col SATA sull'oligonucleotide è protetto e per la rimozione del gruppo acetilico si preparano 10 ml di Deacetylation Solution sciogliendo 347,45 mg di idrossilammina e 93,06 mg di EDTA disodico in 8 ml di PBS 0.2X e 2 ml di acqua. Ai 40 ul di soluzione di oligonucleotide si aggiungono 20 ul di Deacetylation Solution e si mette a incubare a $37^\circ C$ e 700 rpm per 2 ore. In seguito andiamo a filtrare usando filtri *3000 MWCO Microcon (Millipore)* con cut-off 3000 Da, facendo spin a $20^\circ C$ e 12000 rpm per 20 minuti.

3.5.2 Marcatura del target scrambled con dye fluorescente

Per quanto riguarda l'oligonucleotide target, abbiamo preparato di fresco il marcatore liofilizzato Cy3™ *monofunctional* GE Healthcare seguendo questo protocollo:

Aggiungere alla quantità totale di liofilizzato, che serve a marcare 1 mg di proteina, 60 ul di DMF in ambiente anidro sotto Argon e lavorando con la glove bag

Dividere questo volume in 12 aliquote ognuna di 5 ul, sempre in ambiente anidro

Le aliquote hanno un volume di 5 ul e costituiscono 1/12 della quantità totale del marcatore

Conservare le aliquote in una falcon avvolta con alluminio a -20° C.

Per la marcatura abbiamo effettuato questi passaggi:

- Solubilizzare 10 nmoli di oligonucleotide (target-NH₂) in 100 ul di acqua
- Mettere da parte 2 ul, aggiungere 53 ul di acqua per costituire il campione di 55 ul di oligo al tempo t=0
- Prendere 20 ul della soluzione di oligo, aggiungere 7 ul di PBS 1X, 3 ul di acqua e 5 ul di Cy3™ per ottenere 35 ul di soluzione labelling in PBS 0.2X
- Incubare la soluzione, coprendo la vial con alluminio, a 37° C e 700 rpm nell'agitatore
- Dopo 30 minuti prelevare 3 ul di soluzione, portarli a 55 ul con acqua e leggere in HPLC caricando 50 ul
- Ripetere la stessa cosa ogni 30 minuti fino a raggiungere un tempo di incubazione di 2 ore e mezzo.

Andiamo a leggere le soluzioni in HPLC a 260 nm e 550 nm, lunghezza d'onda a cui si ha il massimo assorbimento del fluoroforo, per verificare se la marcatura è avvenuta e in che percentuale.

3.6 Misurazione della fluorescenza

L'oligonucleotide target scrambled a DNA acquistato dalla IDT, Integrated DNA Technologies possiede all'estremità 3' una molecola 6-FAM (6-carbossifluoresceina). Una aliquota da 2 nmoli è stata solubilizzata in PBS 1X per ottenere soluzioni a concentrazione nota: 5 uM, 2.5 uM, 1.25 uM, 0.625 uM, 0.25 uM. Come controllo negativo abbiamo

riempito un pozzetto della piastra con 200 μ l di PBS 1X. La piastra 96-wells per UV contenente le soluzioni e avvolta con alluminio negli intervalli tra le letture è stata inserita nel Fluostar e letta a 260 nm e a 492 nm (per le misure di assorbanza) ed eccitata a 495 nm e letta a 519 nm per le misure in fluorescenza. Sono state compiute letture a 30 minuti, 1 ora, 2 ore, 2 ore e mezzo, 3 ore, 3 ore e mezzo, 4 ore, 4 ore e mezzo, 5 ore, 5 ore e mezzo, 23 ore, 23 ore e mezzo, 24 ore, 24 ore e mezzo dall'inizio dell'esperimento. Abbiamo riportato in grafico le misure di assorbanza e di emissione di fluorescenza nel tempo per ogni concentrazione.

3.7 Dissociazione termica dei due oligonucleotidi complementari

Prima di procedere alla misurazione della temperatura di melting dell'oligonucleotide a doppio filamento formato da probe e target, dobbiamo seguire tali passaggi:

- Studiare le sequenze degli oligonucleotidi complementari in modo da evitare sequenze che siano complementari a RNA umani noti.
- Prevedere una possibile temperatura di melting dal sito web <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/> inserendo una delle due sequenze complementari, la relativa concentrazione, la concentrazione degli ioni presenti in soluzione (nel nostro caso le $[\text{Na}^+]$ e $[\text{Mg}^{++}]$ nel tampone SBF)
- Preparare soluzioni di concentrazione tale che l'assorbimento sia compreso nell'intervallo da 0 a 2 (nel nostro caso abbiamo usato volumi di 1 mL in cuvette semimicro di quarzo)
- Fare rampe di solo tampone, delle singole sequenze e solo dopo del duplex per evitare di comprendere assorbimenti aspecifici
- Ottimizzare la rampa di temperatura in funzione del tempo, al fine di ridurre l'evaporazione delle soluzioni, comprimendola in un intervallo di 10-15 minuti al massimo e partendo da una temperatura non inferiore a 10° C in meno rispetto alla temperatura di melting prevista
- Per ridurre l'evaporazione, si può aggiungere qualche goccia di olio di paraffina sulla superficie della soluzione nella cuvetta.

Abbiamo preparato soluzioni con un volume di 1 ml e di concentrazione circa 1,5 uM di Target e di Duplex formato dall'unione di target e probe, utilizzando gli oligonucleotidi a DNA sintetizzati dalla *IDT, Integrated DNA Technologies* e solubilizzandoli in SBF 1X. Lo strumento impiegato è un *Cary Varian Spectrophotometer UV/vis* dotato di resistenza Peltier (*Dual cell Peltier accessory*). Utilizzando cuvette semimicro di quarzo e impostando una rampa di temperatura da 55° C a 85° C in 10 minuti che include la temperatura di melting teorica, andiamo a valutare l'assorbimento della soluzione di Target. All'assorbanza del Target viene sottratta l'assorbanza della soluzione di SBF di riferimento. Una volta terminato l'esperimento, aggiungiamo una uguale quantità di Probe, lasciamo la soluzione a circa 50° C e facciamo raffreddare lentamente overnight per favorire l'appaiamento più termodinamicamente stabile dei due filamenti. La mattina seguente misuriamo l'assorbanza a 260 nm durante la rampa di temperatura e riportiamo in un grafico l'assorbimento in funzione del tempo e della temperatura.

Abbiamo valutato anche la temperatura di melting dell'ibrido formato dai due oligonucleotidi Probe e Target che presentano una modifica nella posizione 2' dello zucchero. I due oligonucleotidi modificati sono 2'OMe cioè presentano un ossigeno che lega un gruppo alchilico. Sono stati utilizzati probe e target 2'OMe acquistati dalla *Gene Pharma, Shanghai*. Seguendo il protocollo precedentemente visto, prepariamo soluzioni di 700 uL di SBF 1X, Probe, Target e duplex in cuvette semimicro di quarzo. La concentrazione del duplex è circa 2,8 uM. Il duplex viene formato dall'unione delle due soluzioni di Probe e Target, viene fatto denaturare e raffreddare lentamente per permettere l'appaiamento più termodinamicamente stabile dei due filamenti.

Andiamo a leggere l'assorbanza delle soluzioni a 260 nm durante una rampa di temperatura che può andare dai 55° C agli 85° C oppure dai 60° C ai 90° C in 10 minuti quindi con una variazione di 3° C al minuto. Riportiamo gli assorbimenti in funzione della temperatura e del tempo in una tipica curva di melting.

3.8 Elettroforesi Capillare

Gli esperimenti sono stati svolti usando un sistema di elettroforesi capillare P/ACETM MDQ (Figura 3.4) equipaggiato con detector UV o PDA e modulo contenente i campioni a temperatura controllata (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA). Gli elettroferogrammi sono stati raccolti e analizzati tramite 32Karat Software. Per le separazioni in CGE, Capillary Gel Electrophoresis, è stato usato un capillare rivestito lungo 65 cm e con diametro interno 100 μ m, presente all'interno del kit Beckman dsDNA 1000 contenente anche Gel Buffer liofilizzato, Test Mix e Orange G Reference Marker.



Figura 3.4: P/ACETM MDQ Beckman Coulter.

All'inizio di ogni esperimento il capillare viene lavato per 10 minuti a 20 psi con Gel Buffer fresco, mentre tra le iniezioni viene fatto un lavaggio per 6 minuti a 20 psi.

Quando il capillare è nuovo e deve essere usato per la prima volta, è consigliato un lavaggio di 30 minuti a 20 psi con Gel Buffer fresco (Figura 3.5). Il buffer liofilizzato viene reidratato aggiungendo 20 ml di acqua deionizzata e filtrata con filtro da 0.2 μ m alla vial del Gel Buffer. La soluzione viene continuamente miscelata su piastra magnetica con agitatore all'interno per 24 ore fino al completo scioglimento del gel. Prima dell'uso, filtrare il Gel Buffer con filtro da 0.45 μ m e sonicarlo per 1 minuto per rimuovere le bolle di aria. Una volta reidratato va conservato tra 2° C e 8° C.

I campioni di osteopontina e aptamero sono stati solubilizzati in SBF 1X. L'iniezione del campione e la separazione avvengono per voltaggio e a polarità inversa, in modo che il catodo si trovi al sito di iniezione e l'anodo a quello di uscita, impostando le condizioni nel metodo attraverso il software 32Karat.

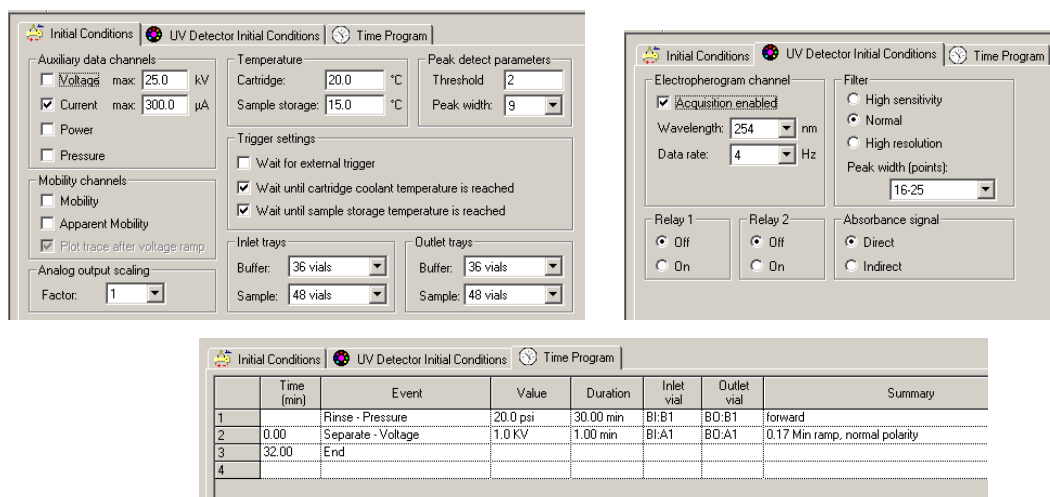


Figura 3.5: Esempio di metodo di lavaggio e condizionamento del capillare.

4 Risultati e Discussione

4.1 Sintesi, purificazione e resa

La resa di una sintesi chimica di un oligonucleotide a RNA è bassa e in generale è inferiore rispetto a quella di un oligonucleotide a DNA. Uno dei motivi di questo problema è il fatto che il gruppo protettore TBDMS in posizione 2' dello zucchero è ingombrante e a causa di questo ingombro sterico l'attacco dell'ossidrile in 5' nella posizione 3' non è favorito. Un altro motivo consiste nella necessità di una estesa deprotezione per rimuovere tutti i gruppi protettori, tra cui il gruppo TBDMS che viene rimosso con TEA·3HF in DMF.

Le soluzioni provenienti dai passaggi di deprotezione vengono analizzate tramite HPLC, cromatografia liquida ad elevata prestazione. Iniettando una soluzione di flow through, ottenuto dalla filtrazione mediante filtri con cut-off di peso molecolare pari a 3000, si osserva che contiene principalmente piccole molecole che escono all'inizio del cromatogramma. Caricando invece la soluzione di retentato, osserviamo dei picchi a tempi più alti che rappresentano due frazioni dell'aptamero, probabilmente le due conformazioni in cui si può trovare più facilmente l'oligonucleotide single-strand in soluzione. Per distinguere le due frazioni e caratterizzarle separatamente, andiamo ad effettuare corse preparative in cui cerchiamo di raccogliere i due picchi in due provette diverse osservando in tempo reale il cromatogramma. Raccogliamo tre frazioni: picco 1 (Figura 4.1), picco 2 (Figura 4.2) e picco TOT che li comprende entrambi.

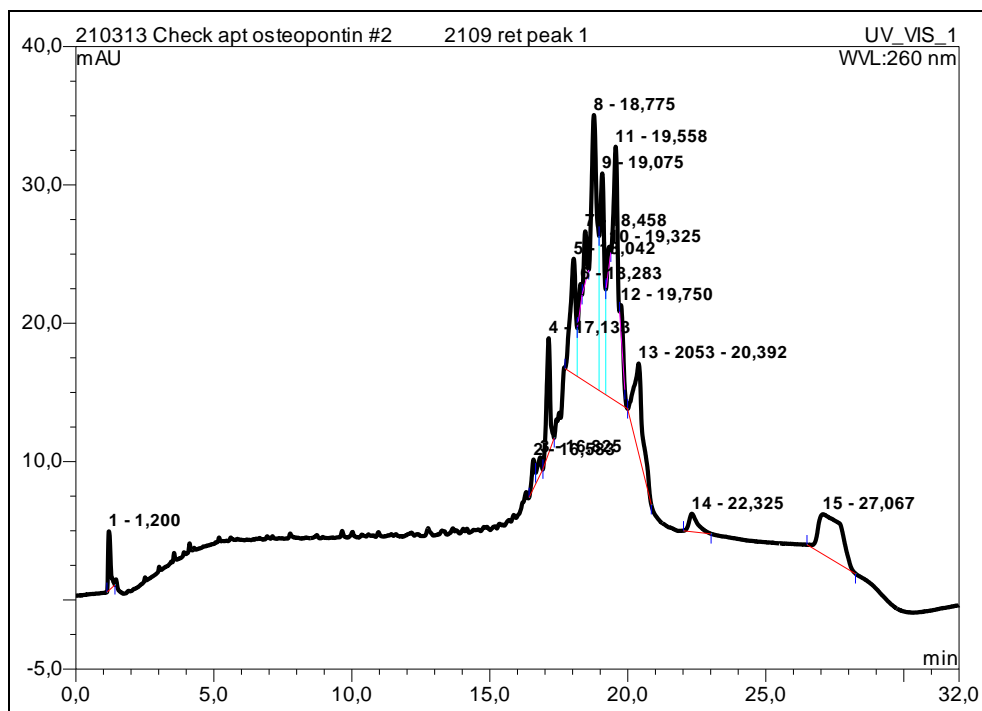


Figura 4.1: Cromatogramma della soluzione "picco 1" dell'aptamero OPN.

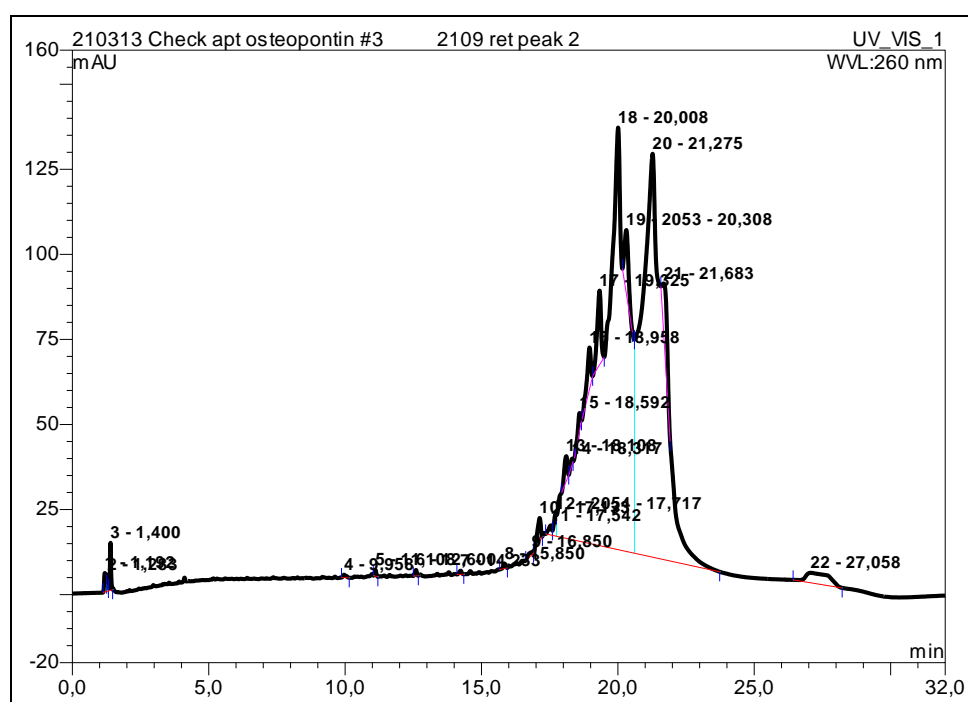


Figura 4.2: Cromatogramma della soluzione "picco 2" dell'aptamero OPN.

Tramite la lettura di assorbanza al Fluostar, abbiamo ricavato la concentrazione e la quantità dei nostri campioni. Le rese sono riportate in tabella:

Stock solution	Concentration	Quantity	Volume
2109 ret peak 1	12.5 uM	12.5 nmol	1 ml
2109 ret peak 2	24.9 uM	37.35 nmol	1.5 ml
2109 ret peak tot	90 uM	45 nmol	0.5 ml
2109 elu	17 uM	5.1 nmol	0.3 ml

La presenza di sequenze complete nell'eluato, insieme ai prodotti a basso peso molecolare, è da imputare alla possibilità delle sequenze oligonucleotidiche di inserirsi nei pori della membrana filtrante e, svolgendosi, passarvi attraverso grazie alla forza centrifuga.

La presenza di due picchi può essere dovuta alla presenza di sequenze incomplete ma anche a diversi ripiegamenti tridimensionali (folding) che la sequenza dell'aptamero può assumere nelle condizioni di corsa.

4.2 Valutazione Affinità

Per valutare la capacità dell'aptamero oligonucleotidico di legarsi alla proteina bersaglio osteopontina è stato utilizzato un approccio di tipo ELONA (Enzyme Linked OligoNucleotide Assay). Tale approccio prevede l'uso sia di anticorpi che di aptameri e inizia immobilizzando covalentemente la proteina OPN su piastre multiwell, facendovi interagire oligonucleotidi (specifici o di controllo) marcati con fluoresceina e rilevandoli mediante un anticorpo primario in grado di legare la fluoresceina. In seguito, aggiungendo un anticorpo secondario coniugato con l'enzima HRP (horse-radish peroxidase), si ottiene nei pozzetti un complesso in grado di convertire un substrato in un prodotto colorato.

La comparsa di una colorazione giallo-arancio è proporzionale alla quantità di complesso presente in ciascun pozzetto e quindi, a concentrazioni simili, ad una maggiore o minore affinità dell'oligonucleotide per la proteina.

Sono state effettuate prove preliminari con l'uso di diverse condizioni di lavaggio per individuare quelle da applicare nei saggi.

In particolare abbiamo effettuato in alcuni pozzetti dei lavaggi con PBS in presenza di un detergente come SDS allo 0,1% per cercare di rimuovere i legami aspecifici più deboli e far emergere quello invece specifico tra l'aptamero o l'anticorpo e la proteina (Figura 4.3).

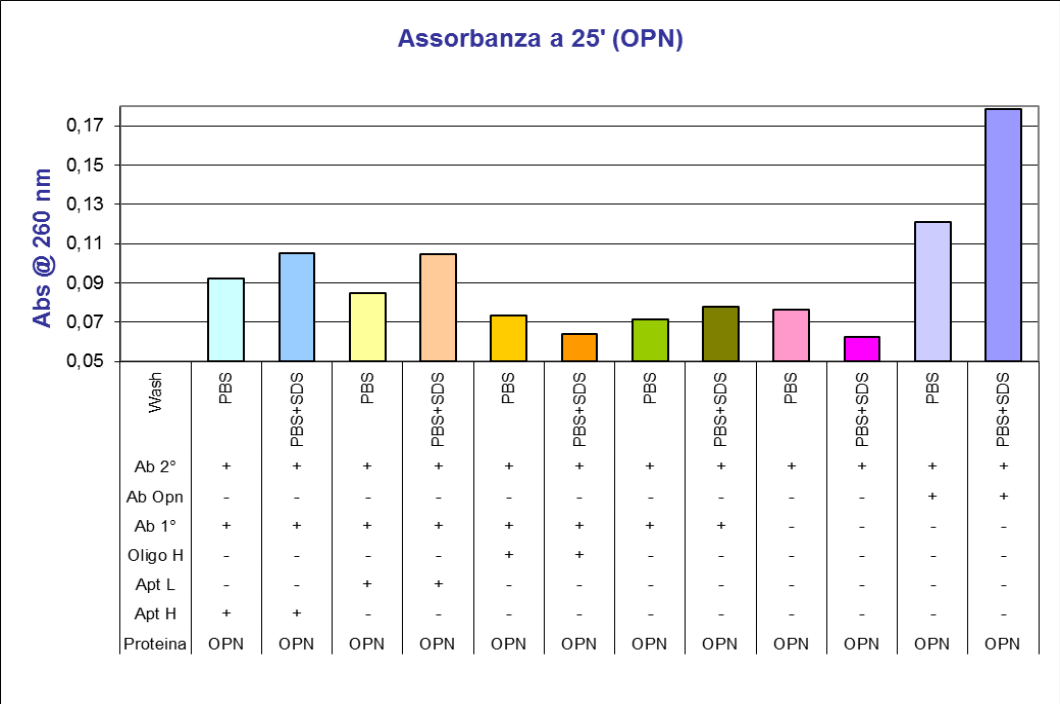


Figura 4.3: Grafico dell'assorbimento rilevato al Fluostar nella prova con SDS.

Si osserva nel caso di lavaggi in presenza di detergente una colorazione più intensa anche in assenza di legame specifico e nonostante lavaggi ripetuti con solo PBS. Si è quindi deciso di utilizzare il lavaggio in assenza di SDS per evitare segnali spuri dovuti all'interazione del detergente con il substrato cromogeno o il processo di sviluppo della colorazione per via enzimatica.

L'aptamero OPN, e la sua capacità di legarsi alla proteina immobilizzata sul fondo dei pozzetti, è stato confrontato con un anticorpo commerciale in grado di legare specificamente questa proteina (Figura 4.4). Come si osserva nel grafico, sia la barra del picco 1 che del picco 2 e del picco tot dell'aptamero esibiscono un rapporto tra assorbanza dell'aptamero e assorbanza dell'anticorpo maggiore di 1. Ciò può indicare che le frazioni dell'aptamero, in particolare la seconda, mostrano un'affinità paragonabile o superiore a quella che esibisce l'anticorpo specifico per l'osteopontina.

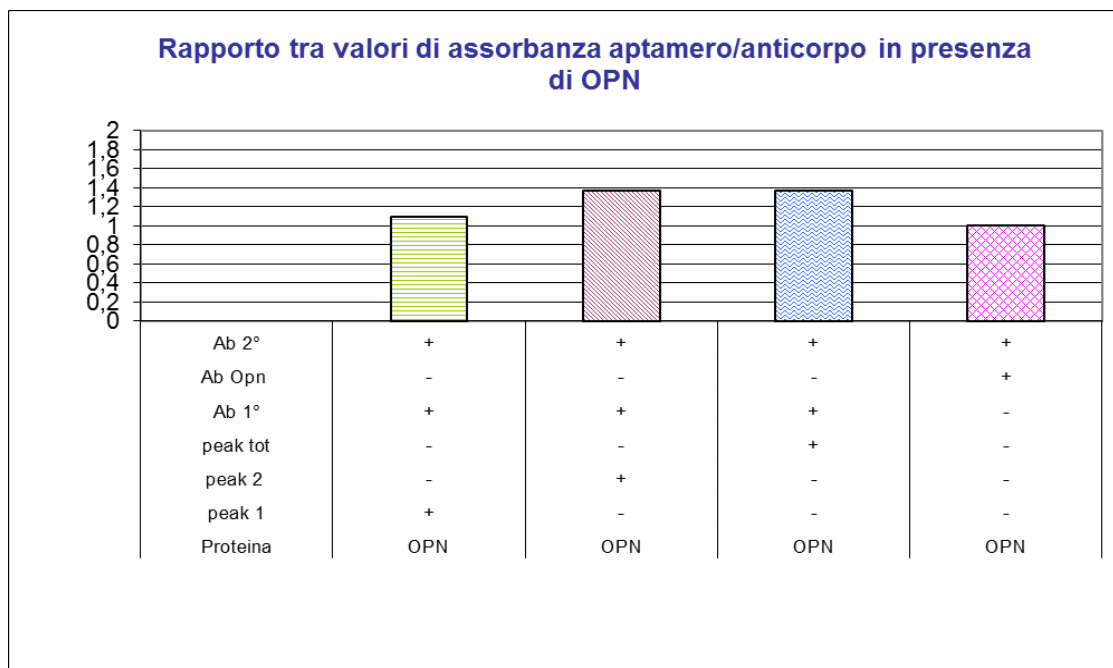


Figura 4.4: Illustrazione dei risultati del rapporto tra assorbanza dell'aptamero e dell'anticorpo.

Per entrambe le molecole (anticorpo e aptamero) è stato testato anche il legame aspecifico su pozzetti ricoperti di albumina e mettendo in grafico il rapporto tra il segnale misurato nei pozzetti con OPN e quello dovuto al legame aspecifico con l'albumina (Figura 4.5).

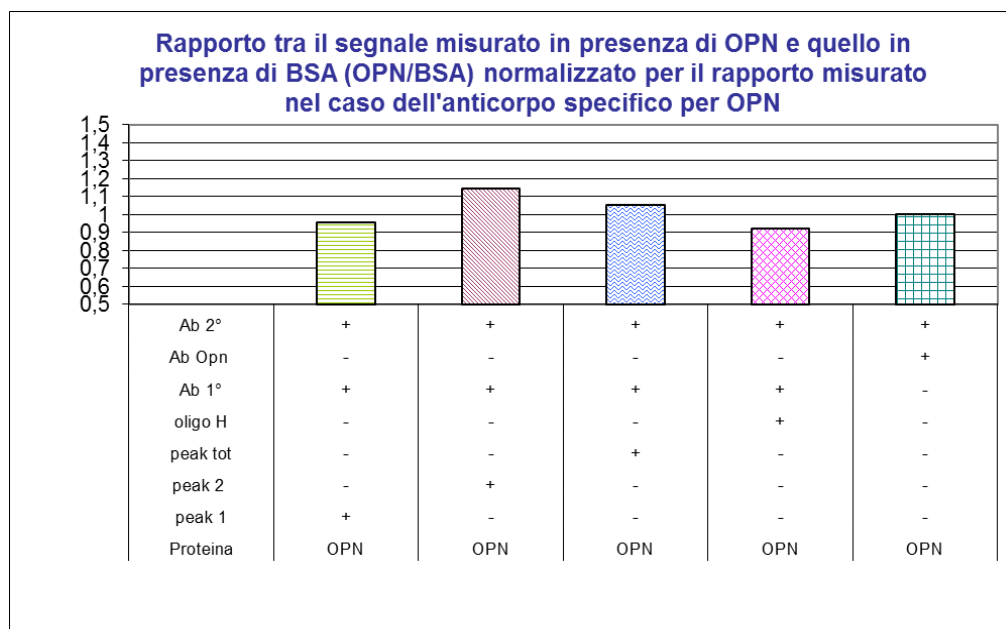


Figura 4.5: Illustrazione dei risultati in rapporto al segnale misurato in presenza di BSA.

L'assorbimento nel caso dell'anticorpo specifico per OPN è uguale ad 1 perchè abbiamo normalizzato i risultati dei rapporti per questo valore. Nel caso dell'oligonucleotide aspecifico il rapporto risulta minore di 1 quindi il legame con OPN è caratterizzato da una minore specificità di quella dell'anticorpo specifico per la proteina. Le frazioni dell'aptamero presentano una specificità comparabile a quella dell'anticorpo. L'assorbimento del picco 1 dell'aptamero è leggermente inferiore a 1, ma il picco TOT e soprattutto il picco 2 esibiscono dei valori del rapporto simili o leggermente superiori rispetto all'anticorpo specifico per la proteina.

L'aptamero OPN, e soprattutto la frazione di aptamero corrispondente al secondo picco, mostra quindi una specificità nei confronti del suo bersaglio biologico (rispetto all'albumina) comparabile con quella dell'anticorpo.

L'aptamero, stabile alle nucleasi, da noi sintetizzato con monomeri a RNA e 2'OMe e marcato all'estremità 3' con fluoresceina è quindi in grado di riconoscere e legare la sua proteina bersaglio ed è disponibile per l'immobilizzazione su diverse nanostrutture in fase di studio da parte di altri gruppi di ricerca.

4.3 Marcatura degli oligonucleotidi complementari

Seguendo la strategia del progetto di creare un sistema di distacco degli oligonucleotidi ed un conseguente rilascio del farmaco nel sito di interesse, gli oligonucleotidi complementari probe e target sono stati modificati chimicamente alle estremità. Sul probe è stata introdotta una porzione spaziatrice terminante con un gruppo sulfidrilico, il target complementare è stato marcato con un fluorocromo.

L'oligonucleotide probe è stato fatto reagire con il crosslinker SATA, un estere N-idrossisuccinimidico dell'acido S-acetiltioacetico, e poi deprotetto con idrossilammina cloridrato per liberare il gruppo sulfidrilico. Successivamente, per purificare l'oligonucleotide modificato, è stata compiuta una filtrazione con filtri di cut-off 3000 Da che trattengono il probe e rimuovono i reagenti della reazione. Dalla lettura di assorbanza a 260 nm al Fluostar abbiamo però verificato che la filtrazione non è avvenuta con successo poichè l'assorbimento dei retentati è risultato maggiore di quello massimo previsto. Ciò significa che la soluzione del retentato contiene qualcosa in più che assorbe a 260 nm, come i sottoprodotti che dovevano essere eliminati (N-idrossisuccinimmide). Quindi

andiamo a svolgere un'ulteriore filtrazione con gli stessi filtri di cut-off 3000 Da ed analizziamo le soluzioni risultanti in HPLC.

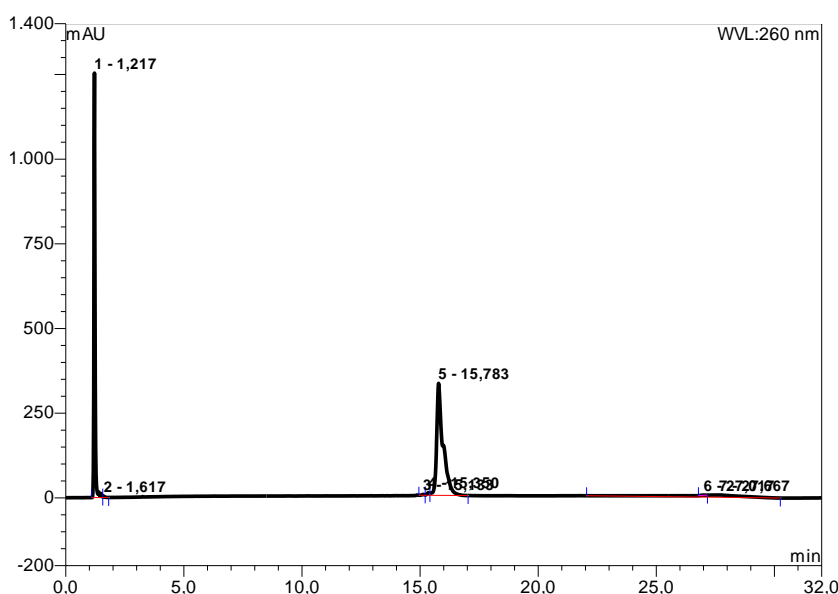


Figura 4.6: Cromatogramma della soluzione "flow through" dell'oligonucleotide probe-SH.

In Figura 4.6 osserviamo il cromatogramma del “flow through” che deriva dalla soluzione di retentato che non è stata filtrata efficacemente. La soluzione contiene una quantità elevata di sostanze che escono subito dalla colonna che rappresentano i sottoprodotti della reazione che volevamo eliminare. La soluzione contiene però anche una piccola quantità di oligonucleotide che non è stato trattenuto dal filtro che esce a circa 16 minuti. I sottoprodotti a basso peso molecolare che escono a tempi brevi sono i responsabili dell’elevato assorbimento totale della soluzione che si osservava allo spettrofotometro (fluostar).

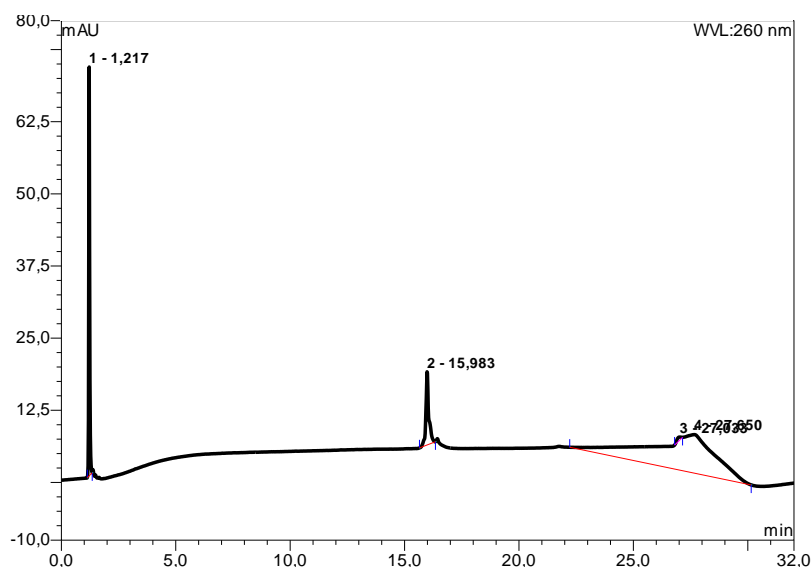


Figura 4.7: Cromatogramma del "retentato" dell'oligonucleotide probe-SH.

La soluzione che invece è stata trattenuta nel filtro e rivoltata in una nuova vial, che chiamiamo “retentato”, presenta un cromatogramma riportato in Figura 4.7. Si osserva che l’oligonucleotide non viene efficacemente recuperato e che risulta comunque contaminato dai sottoprodotti a basso peso molecolare responsabili dell’elevato assorbimento UV. Per gli scopi del progetto non è necessaria una completa rimozione dei sottoprodotti in oggetto in quanto il gruppo tiolico in coda all’oligonucleotide è l’unico a poter reagire con la superficie in oro delle nanoparticelle da funzionalizzare, perciò si è deciso di non proseguire con altre metodiche di purificazione. Da questi risultati emerge come l’utilizzo dei filtri 3000 MWCO Microcon (Millipore) per la separazione di oligonucleotidi di circa 20 nucleotidi da sottoprodotti, cross-linkers e dyes a basso peso molecolare non garantisca un efficiente recupero delle specie marcate purificate. Se fosse necessaria una rimozione completa dei sottoprodotti si potrebbe quindi ricorrere ad una separazione in HPLC nelle condizioni previste dalle corse analitiche presentate ma con raccolta delle frazioni ed utilizzo di una colonna semipreparativa.

L’efficacia della marcatura del target con Cy3 Mono Reactive è stata seguita nel tempo effettuando dei prelievi dalla soluzione labeling e caricandoli in HPLC (Figura 4.8). Abbiamo eseguito dei prelievi a 30 minuti, 1 ora, 1 ora e mezzo, 2 ore, 2 ore e mezzo, dall’inizio della reazione.

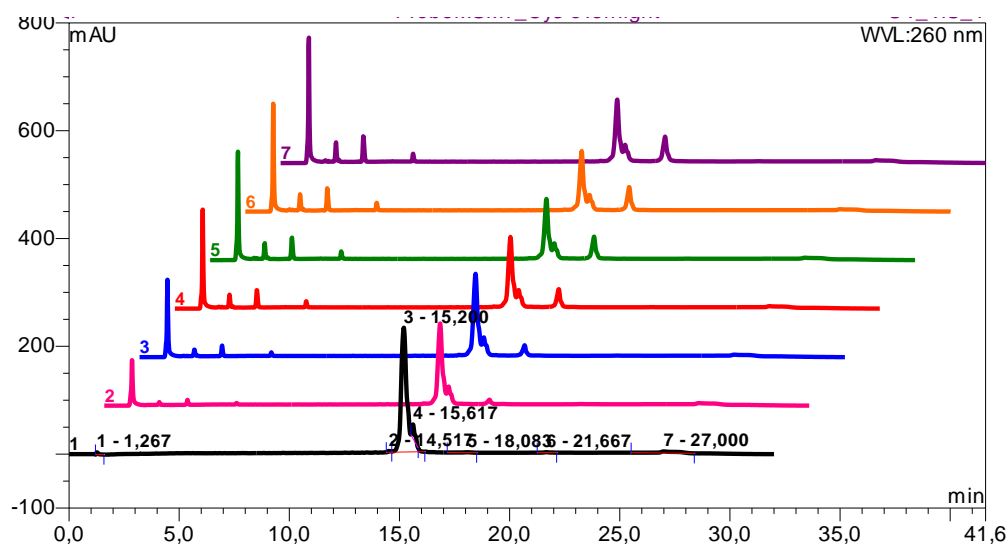


Figura 4.8: Cromatogrammi durante la marcatura del target al tempo $t=0$ (1), $t=30$ minuti (2), $t=1$ ora (3), $t=1$ ora 30 (4), $t=2$ ore (5), $t=2$ ore 30 (6), overnight (7).

La soluzione è stata lasciata overnight e la mattina seguente fatto un altro prelievo. Abbiamo osservato l'assorbanza delle soluzioni a 260 nm, lunghezza d'onda degli oligonucleotidi, e a 550 nm, alla quale si ha il massimo assorbimento del marcatore. A 260 nm abbiamo verificato la presenza di due picchi, uno a 15 e l'altro a 17 minuti. Il picco a 15 minuti non è presente alla lunghezza d'onda di 550 nm, dove vediamo solo quello a 17. Sono state ricavate l'altezza e l'area dei picchi. È stata calcolata la somma delle aree dei due picchi a 260 nm ed è risultata costante ai vari tempi, coerentemente all'idea che la quantità di oligonucleotide che viene prelevata e iniettata nello strumento ad ogni tempo dovrebbe essere uguale. Il rapporto tra la somma delle aree a 260 e l'area a 550 nm dà un numero che diminuisce nel tempo in quanto l'area del picco a 550 nm aumenta, parallelamente all'evolvere della marcatura. Il picco a 550 nm corrisponde all'oligonucleotide che è stato marcato e la sua area nel tempo dovrebbe aumentare fino ad un limite, oltre il quale l'oligonucleotide non può più essere marcato. Il picco a 15 minuti visibile a 260 nm corrisponde all'oligonucleotide non marcato e nel tempo diminuisce, in parallelo all'aumento del picco dell'oligonucleotide marcato. Il rapporto tra l'area del picco a 17 minuti a 260 nm e a 550 nm dà un numero costante, circa 1,5. Questo significa che la marcatura avviene in rapporto 1: 1.

Andando a valutare l'entità della marcatura a diversi tempi di reazione (da 30' a overnight) si è potuto osservare che si ottiene un'efficiente e completa marcatura dei gruppi amminici primari delle sequenze oligonucleotidiche con fluorocromi con gruppi succinimidil estere in 2 ore e 30'. Vista l'omogeneità delle proprietà chimico-fisiche di tutte le sequenze

nucleotidiche, questo tempo di reazione (in queste condizioni di temperatura, pH e salinità) potrà essere applicato anche nel caso di altre sequenze.

4.4 Valutazione della persistenza nel tempo della fluorescenza del 6-FAM con cui è marcato il target

Le soluzioni di oligonucleotide target marcato con la molecola 6-FAM sono state analizzate tramite fluorescenza su piastra. Sulla base di dati presenti in letteratura [You et al., Biopolymers 2011], è stato osservato che la fluorescenza della carbossifluoresceina diminuisce in particolari condizioni, come a pH minore di 7, a causa della prevalenza della forma protonata.

L'analisi su piastra al Fluostar è stata condotta al fine di verificare se in soluzione tamponata, in condizioni che mimano quelle sperimentali per la funzionalizzazione delle nanoparticelle e le successive dissociazioni ed analisi, vi sia una riduzione rilevante della fluorescenza. Sono state preparate soluzioni in PBS 1X di target marcato a concentrazione nota. Abbiamo svolto letture di assorbanza a 260 nm e 492 nm e misure di emissione di fluorescenza a determinati tempi.

L'emissione di fluorescenza si mantiene pressochè costante nel tempo, diminuendo leggermente (5-10% circa) dopo 23 ore dall'inizio dell'esperimento (Figura 4.9).

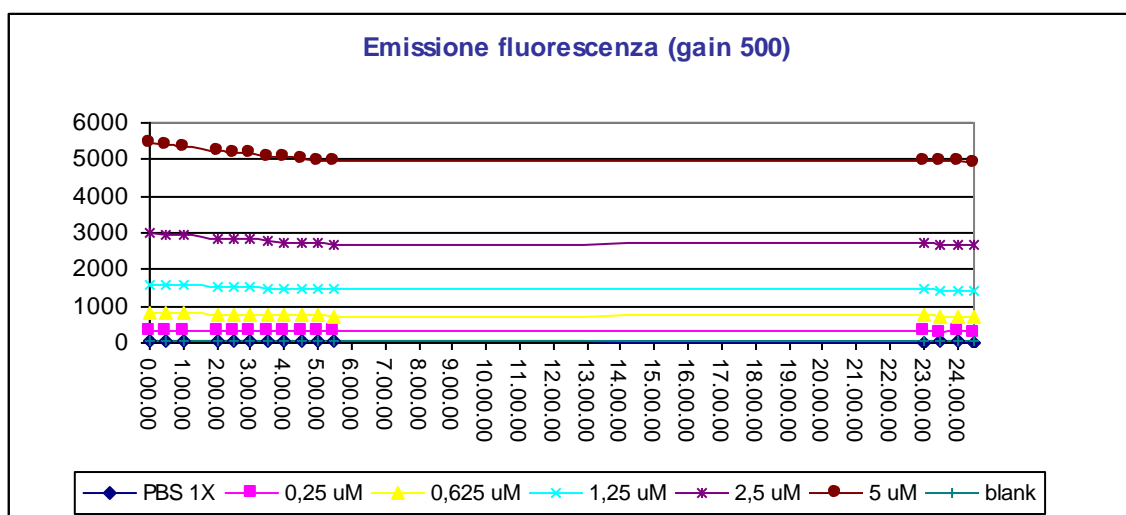


Figura 4.9: Emissione di fluorescenza delle soluzioni di oligonucleotide-FAM nel tempo.

Parte della riduzione di fluorescenza che si osserva può essere imputabile anche al photobleaching dovuto alle ripetute misurazioni. Infatti, in condizioni di illuminazione di elevata intensità, la distruzione irreversibile del fluoroforo o “photobleaching” diviene il fattore limitante la rilevazione della fluorescenza. Song et al. [Song et al. Biophys J vol 70 1996] hanno dimostrato che il meccanismo di photobleaching della fluoresceina viene spiegato almeno in parte dall’accumulo dello stato eccitato di tripletto.

Durante l’esperimento è stata continuamente monitorata l’assorbanza delle soluzioni sia a 260 nm che 492 nm ed abbiamo osservato che si è mantenuta costante.

La riduzione di fluorescenza, in quanto in piccola percentuale, non compromette l’utilizzo delle sonde nei test preliminari per effettuare la dissociazione termo-foto indotta del doppio filamento.

4.5 Dissociazione termica degli oligonucleotidi complementari

L’individuazione della temperatura di dissociazione di due sequenze complementari in un tampone che simula in termini di salinità e pH il plasma è di interesse per lo sviluppo di un sistema per il rilascio localizzato di molecole (farmaci) vedi Parte Sperimentale, paragrafo 2.5.

La soluzione risultante dall’unione di probe e target in tampone SBF viene riscaldata fino a denaturare l’oligonucleotide per risalire alla temperatura di melting del duplex in esame. Durante la rampa di temperatura abbiamo misurato l’assorbanza utilizzando uno spettrofotometro UV/vis e cuvette di quarzo. Abbiamo misurato l’assorbanza del duplex formato sia dagli oligonucleotidi a DNA che dagli oligonucleotidi a RNA 2’OMe.

Inizialmente eseguiamo l’esperimento misurando l’assorbimento durante la rampa di temperatura di solo uno dei due oligonucleotidi solubilizzato in tampone SBF 1X (Figura 4.10).

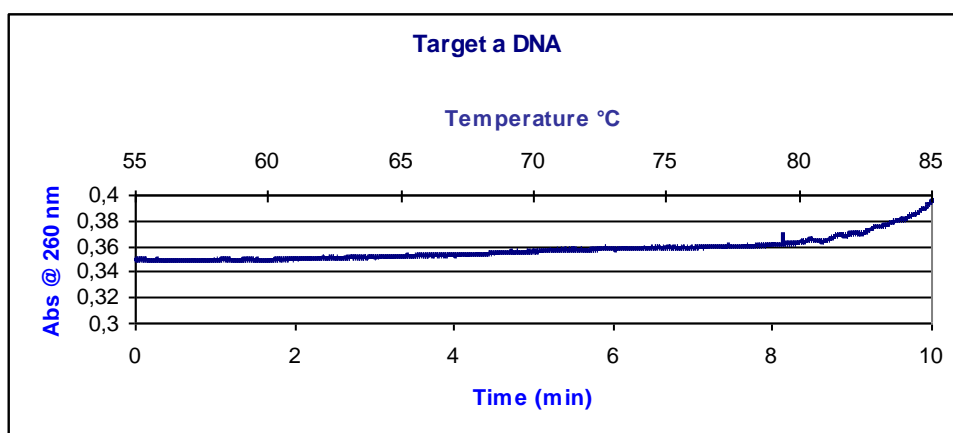


Figura 4.10: Assorbimento del target a DNA 1,5 uM durante la rampa di temperatura.

L'assorbimento dell'oligonucleotide target a DNA durante il riscaldamento rimane più o meno costante, aumentando leggermente tra 8 e 10 minuti.

Oligo Analyzer prevede per il duplex a DNA di concentrazione 1,5 uM una temperatura di melting di 68,9° C.

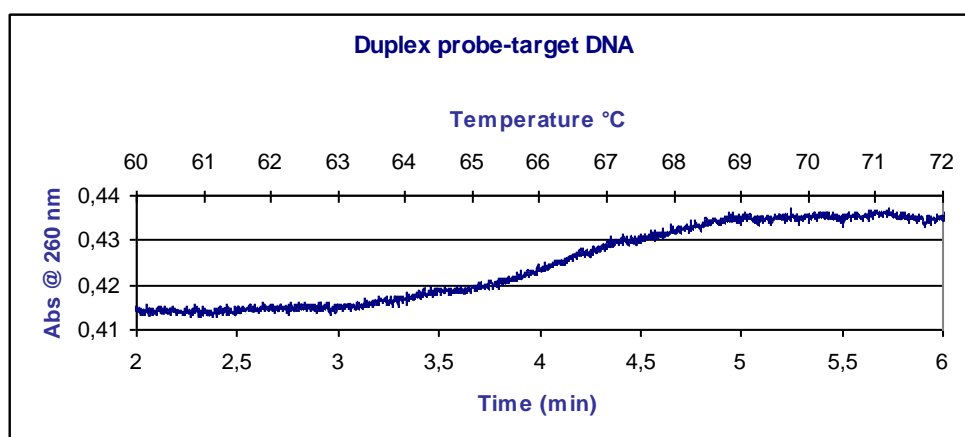


Figura 4.11: Particolare dell'assorbimento del duplex a DNA durante la rampa di temperatura.

Riportando in un grafico l'assorbanza nel tempo e durante una rampa di temperatura si ottiene una curva sigmoide ed il punto di flesso, corrispondente allo stato in cui il duplex è al 50% nella forma a singolo filamento e al 50% nella forma a doppio filamento, viene indicato come T_m cioè temperatura di melting. Rispetto alla temperatura di melting prevista da Oligo Analyzer per il duplex a DNA, cioè 68,9° C, la temperatura che ricaviamo dal nostro esperimento svolto in un tampone SBF 1X è leggermente inferiore

(Figura 4.11). Infatti nelle nostre condizioni il duplex si trova al 50% nella forma a singolo filamento quando raggiunge la temperatura di 66° C circa.

Siamo andati anche a valutare la temperatura di melting dell'ibrido formato dai due oligonucleotidi probe e target che presentano una modifica nella posizione 2' dello zucchero. Abbiamo comparato la loro temperatura di melting con quella dei corrispondenti deossiribonucleotidi (DNA) confermando la tesi di una loro maggiore stabilità e quindi di una T melting più alta. Infatti *Freier et al.* [Freier et al., Nucleic Acid Research 1997] hanno riportato che, in generale, modifiche che risultano in duplex più stabili contengono un eteroatomo nella posizione 2' dello zucchero.

La temperatura di melting prevista per il duplex formato dagli oligonucleotidi 2'OMe è 77,39° C ed è stata ricavata su <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html> inserendo la sequenza e la concentrazione del target, la concentrazione dei sali in SBF e selezionando "ssRNA" come molecola. Anche in questo caso abbiamo prima verificato l'assorbimento di un solo oligonucleotide solubilizzato nel tampone (Figura 4.12).

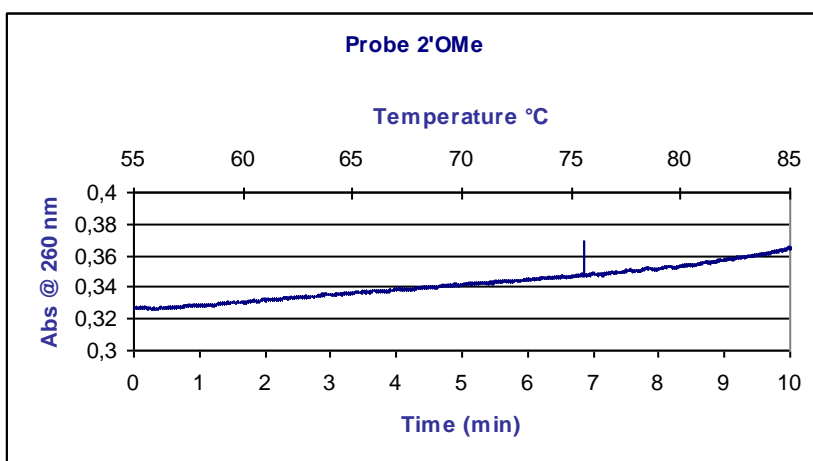


Figura 4.12: Assorbimento del probe 2'OMe 1,5 uM.

Il duplex formato dagli oligonucleotidi 2'OMe si trova alla concentrazione circa 2,8 uM solubilizzato nel tampone SBF, denaturato e fatto raffreddare lentamente overnight per permettere l'appaiamento più termodinamicamente stabile.

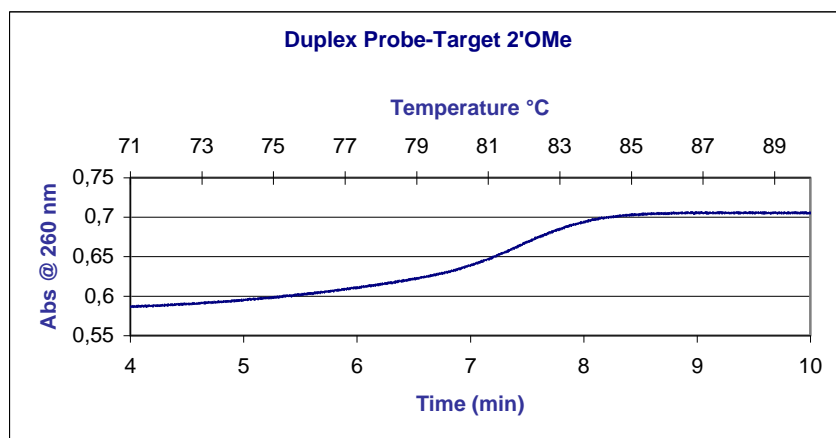


Figura 4.13: Particolare dell'assorbimento del duplex 2'OMe 2,8 uM durante la rampa di temperatura.

Rispetto alla temperatura di melting prevista per il duplex 2'OMe, la temperatura che troviamo sperimentalmente è leggermente superiore (Figura 4.13). Infatti il punto di flesso della curva sigmoide di assorbimento corrisponde ad una temperatura di circa 80° C. Ciò conferma anche la tesi di una maggiore stabilità del duplex formato da oligonucleotidi a RNA e in particolare oligonucleotidi 2'OMe rispetto a quello a DNA, dimostrato da una T melting più elevata.

I dati ottenuti da questi esperimenti serviranno da guida per lo sviluppo di un sistema di irraggiamento delle nanostrutture d'oro in grado di indurre un aumento locale di temperatura che consenta la dissociazione delle sequenze in oggetto e la liberazione delle molecole legate alla sequenza target.

4.6 Elettroforesi Capillare

Sempre nell'ottica della valutazione dell'interazione tra aptamero OPN e proteina bersaglio e tra i due strand complementari (probe e target), è stata valutata la mobilità elettroforetica delle due molecole, separatamente e in miscela. In Elettroforesi Capillare abbiamo valutato la mobilità dei nostri oligonucleotidi probe e target, dell'aptamero e della proteina osteopontina. Abbiamo utilizzato un capillare rivestito e riempito con una matrice semisolido impiegando il kit dsDNA 1000 per oligonucleotidi double-strand. La separazione viene svolta in un gel fisico contenente poliacrilamide lineare in bassa percentuale che conferisce bassa viscosità ed elimina il flusso elettrosmotico. L'aptamero e gli oligonucleotidi probe e target presentano caratteristiche fortemente negative grazie ai

gruppi fosfato quindi dovrebbero muoversi verso l'elettrodo positivo all'uscita del capillare (la separazione viene effettuata a polarità inversa). Lo stesso la proteina osteopontina, che presenta un punto isoelettrico di circa 4, quindi al pH fisiologico del tampone SBF è carica negativamente. D'altra parte oligonucleotidi e proteine assorbono nell'UV per motivi diversi: l'assorbimento di un oligonucleotide è proporzionale al numero delle sue basi azotate, quindi sarà elevato, mentre una proteina dà un assorbimento nell'UV solo per la presenza di amminoacidi aromatici come fenilalanina, tirosina e triptofano.

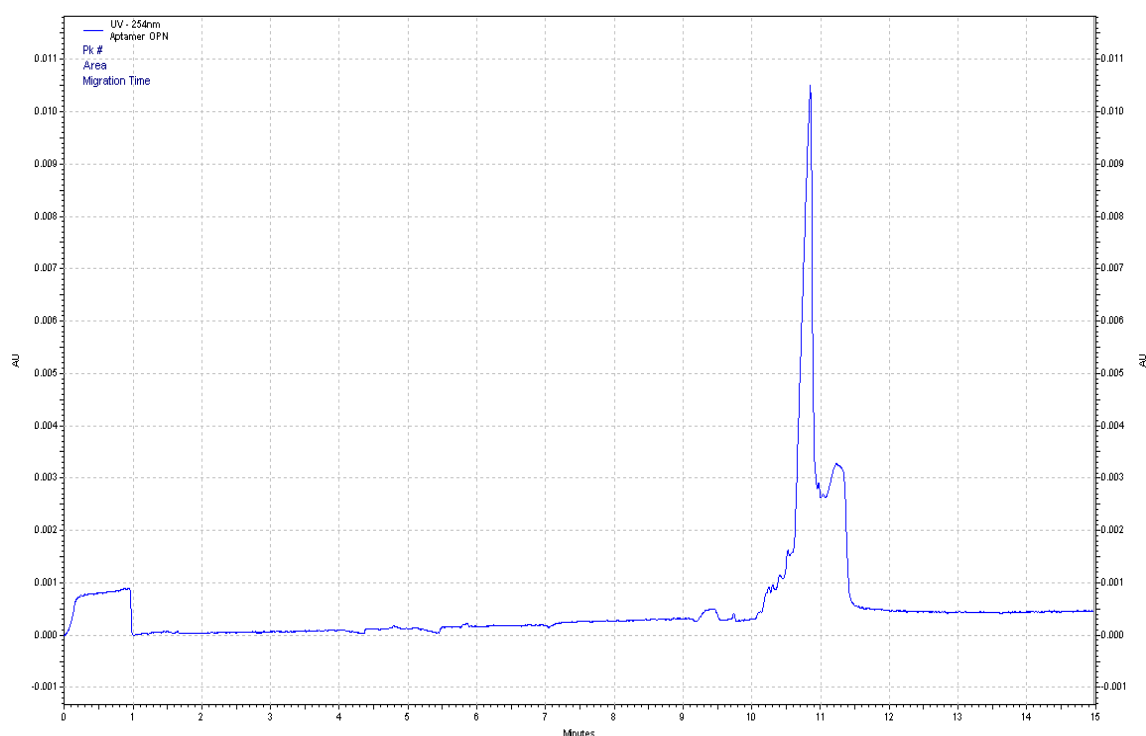


Figura 4.14: Elettroferogramma dell'aptamero diretto contro OPN in SBF 1X.

Nell'elettroferogramma sopra riportato (Figura 4.14) osserviamo l'assorbimento a 254 nm della soluzione di aptamero in tampone SBF 1X e contenente un marker di riferimento (Orange G) diluito in acqua, iniettato in modo elettrocinetico e svolgendo la separazione a 20 kV. A 10,5 minuti si ha un aumento dell'assorbanza che si esplica nell'uscita di un picco sdoppiato che termina a 11,5 minuti e che può corrispondere alle due conformazioni principali che l'aptamero tende ad assumere in soluzione. Dall'altezza del primo picco rispetto al secondo si può vedere che una conformazione è favorita rispetto all'altra. Il picco dell'Orange può essere compreso nel picco dell'aptamero, il che può significare che l'Orange tende ad interagire con il single-strand in soluzione.

Un'aliquota di human OPN da 5 ug, corrispondente a circa 3 ul, e a cui è stato aggiunto il marker diluito, è stata analizzata con lo stesso metodo di corsa utilizzato per l'aptamero (Figura 4.15). Come si osserva nell'elettroferogramma, il picco più alto esce a circa 9,5 minuti e può corrispondere alla proteina, mentre il picco più basso a circa 10,2 minuti può essere dovuto all'Orange G.

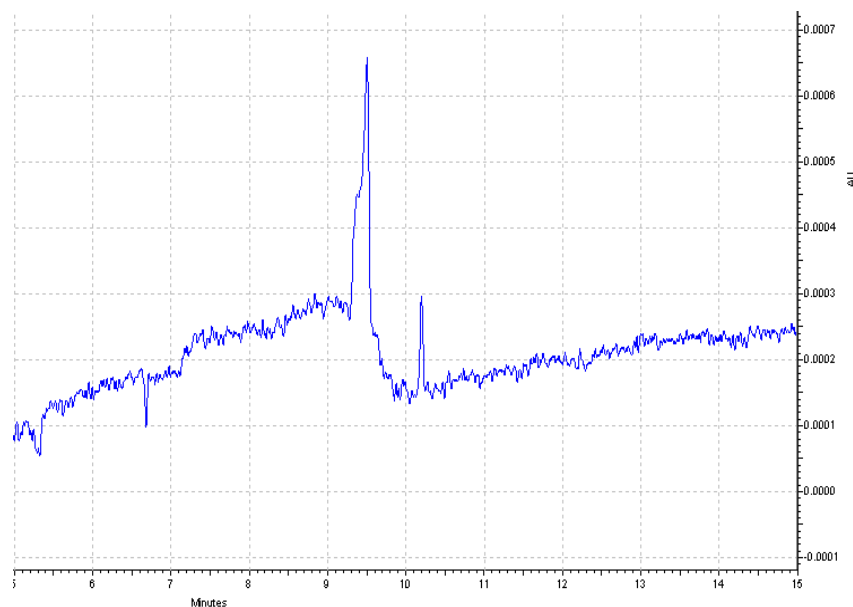


Figura 4.15: Elettroferogramma di OPN.

Unendo le due soluzioni di OPN e aptamero, ma lasciando una quantità maggiore del secondo, si osserva l'elettroferogramma riportato in Figura 4.16. I due campioni si mantengono come picchi separati e sono rilevati dal detector ai tempi delle corse precedenti.

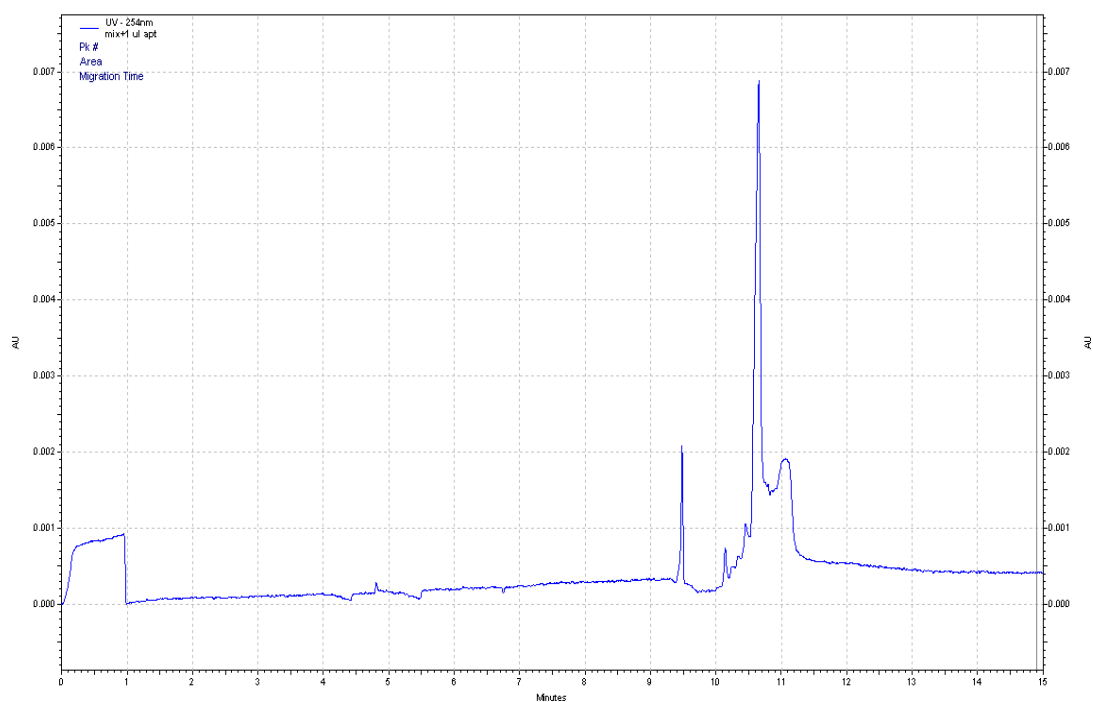


Figura 4.16: Elettroferogramma della miscela OPN e aptamero con una prevalenza del secondo.

Quando alla miscela di aptamero e OPN della corsa precedente viene aggiunta una certa quantità di OPN, l'elettroferogramma cambia (Figura 4.17).

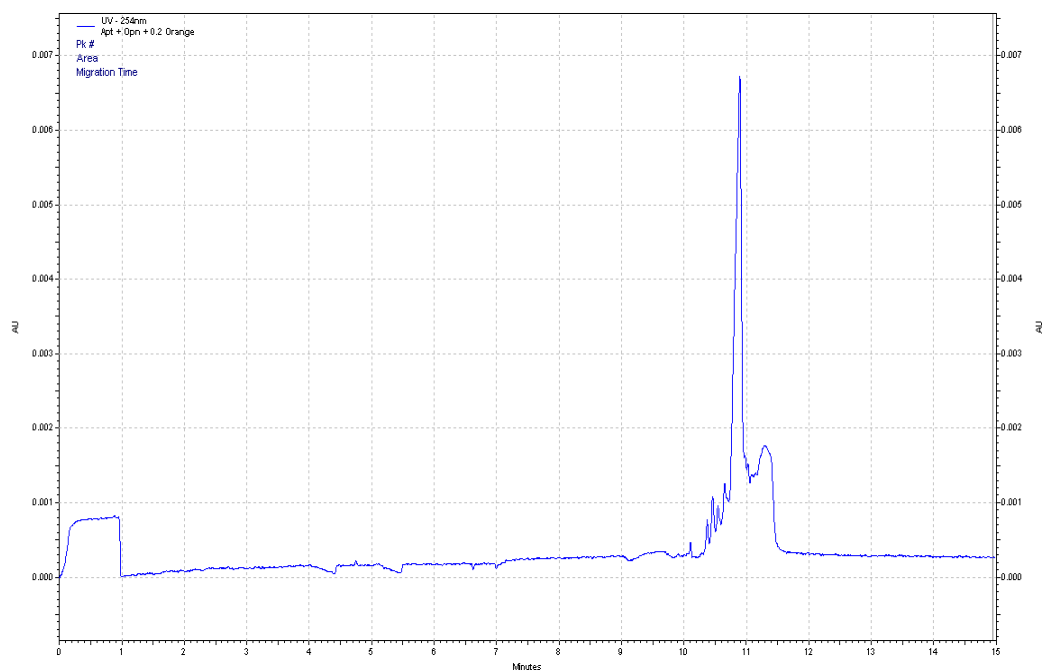


Figura 4.17: Elettroferogramma della miscela aptamero e OPN.

Si osserva un picco slargato formato da più elementi che esce tra 10 e 11,5 minuti, probabilmente dovuto all'interazione specifica tra aptamero e OPN. L'aptamero e la proteina sembrano quindi riconoscersi e legarsi con una certa affinità, che avevamo già osservato nei saggi ELONA, e che rappresenta l'ipotesi che volevamo verificare.

In Elettroforesi Capillare viene valutata anche l'interazione tra i due strand complementari probe e target, separatamente ed in miscela, la cui caratterizzazione rientra nella seconda parte del progetto Encoder. Gli oligonucleotidi 2'OMe sono solubilizzati in tampone SBF 1X e iniettati in modo elettrocinetico a 20 kV nelle stesse condizioni utilizzate nelle corse precedenti. Sono riportati gli elettroferogrammi dei singoli oligonucleotidi in SBF.

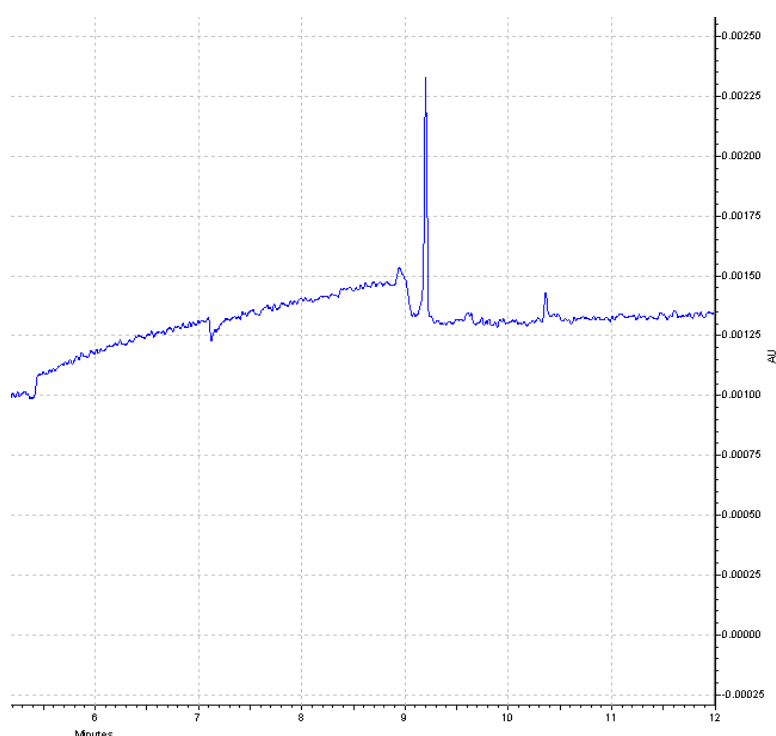


Figura 4.18: Elettroferogramma dell'oligonucleotide probe 2'OMe in SBF.

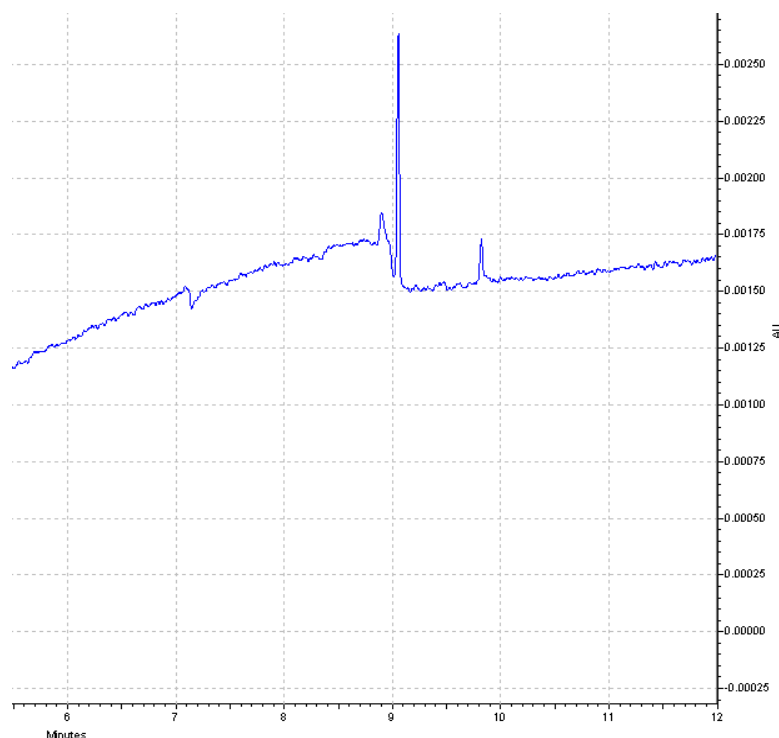


Figura 4.19: Elettroferogramma dell'oligonucleotide target 2'OMe in SBF.

In Figura 4.18 si osserva un picco principale a 9,2 minuti circa, che corrisponde alla conformazione principale dell'oligonucleotide probe; picco che invece troviamo leggermente anticipato a 9 minuti nel caso del target complementare (Figura 4.19). Sono presenti anche dei picchi bassi a 9,8 e 10,4 minuti circa che possono rappresentare una diversa conformazione dell'oligonucleotide che risulta essere meno favorita. Unendo le due soluzioni in miscela, si osserva un picco ampio tra 8,5 e 9 minuti che indica la formazione del doppio filamento costituito da probe e target complementari in soluzione (Figura 4.20).

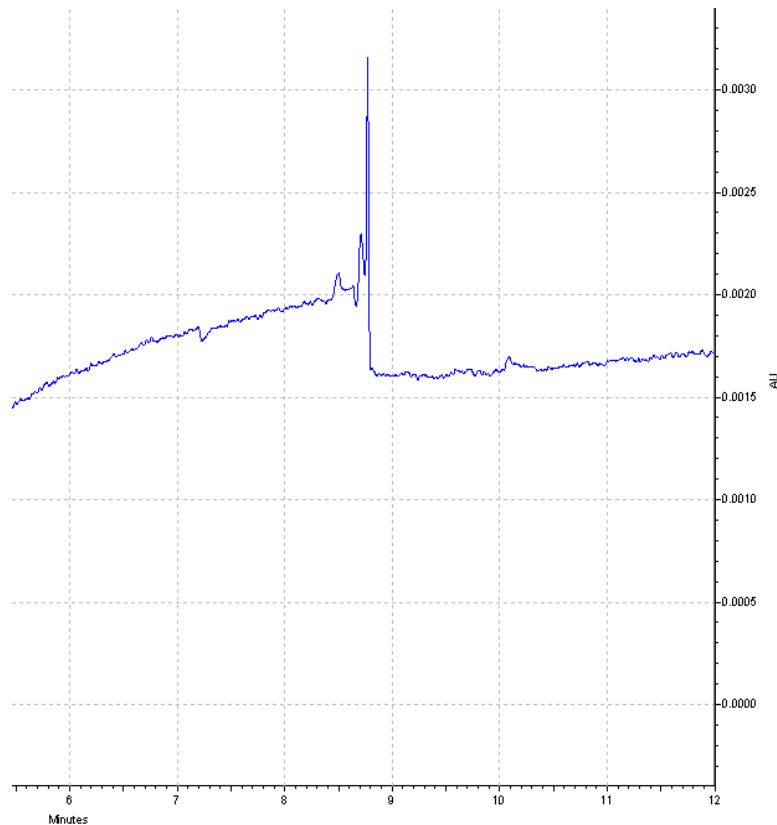


Figura 4.20: Elettroferogramma della miscela probe e target complementari.

Quindi, stimando la mobilità della proteina e degli oligonucleotidi in Elettroforesi Capillare, abbiamo avuto la conferma di una loro reciproca interazione e di una specificità di legame importante che consentono l'utilizzo di tali elementi nella costruzione di nanoparticelle funzionalizzate per il riconoscimento di marker molecolari di patologia e la creazione di "delivery system" per il rilascio controllato di farmaci nel sito di interesse.

Nel loro complesso, le attività sperimentali condotte durante questo lavoro di tesi hanno permesso la progettazione, la realizzazione, la marcatura e la successiva caratterizzazione degli oligonucleotidi sintetici previsti dal progetto di ricerca ENCODER.

Sequenze oligonucleotidiche sono ora a disposizione dei gruppi di ricerca che provvederanno alla loro integrazione con nanoparticelle di vario genere, per la realizzazione di nanostrutture per impiego diagnostico/terapeutico.

Bibliografia

Andrei Drabovich, Samuel Lunenfeld, “Aptamers in Bioanalysis”, Bioanalytical Chemistry, Lectures 2009.

[http://www.yorku.ca/skrylov/Teaching/BioanalyticalChemistry/Aptamers_1.pdf]

Charles E. Murry, Cecilia M. Giachelli, Stephen M. Schwartz, and Rudolf Vracko, “Macrophages Express Osteopontin during Repair of Myocardial Necrosis”, American Journal of Pathology, Vol.145 (6), Dicembre 1994.

<http://www.atdbio.com/content/53/DNA-duplex-stability> “DNA Duplex Stability”.

Integrated DNA Technologies “Calculation of T_m for Oligonucleotide Duplexes” ©2005, 2010 e 2011.

Integrated DNA Technologies “Capillary Electrophoresis of Oligonucleotides” ©2005, 2010 e 2011.

Jin Xie, Seulki Lee, Xiaoyuan Chen “Nanoparticle-based theranostic agents”, Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 62 (2010), p. 1064-1079.

Meng Jing, Michael T. Bowser, “Methods for measuring aptamer-protein equilibria: A review”, Analytica Chimica Acta, Vol. 686 (2011), p. 9-18.

Mykola Ya Spivak, Rostyslav V Bubnov, Ilya M Yemets, Liudmyla M Lazarenko, Natalia O Tymoshok and Zoia R Ulberg “Gold nanoparticles – the theranostic challenge for PPPM: nanocardiology application”, The EPMA Journal, Vol. 4(18), 2013.

Naveed Ahmed, Hatem Fessi and Abdelhamid Elaissari, “Theranostic applications of nanoparticles in cancer”, Drug Discovery Today Vol. 17 (17/18), September 2012.

Nikolaos G. Frangogiannis, “Matricellular Proteins in cardiac adaptation and disease”, Physiol Rev, Vol. 92, p. 635-688, 2012.

Norbert Frey, Hugo A. Katus, Eric N. Olson and Joseph A. Hill, "Hypertrophy of the heart: A new therapeutic target?", *Circulation*, Vol. 109, p. 1580-1589, 2004.

Schwartz and Guttman, Beckman Coulter "Separation of DNA by Capillary Electrophoresis", *Capillary Electrophoresis, Methods In Molecular Biology™*, Vol. 384, p. 415-429, 2008.

Sjöback, Nygren, Kubista "Absorption and fluorescence properties of fluorescein" *Spectrochimica Acta Part A*, Vol. 51 (6), p. L7-L21, 1995.

Song, Varma, Verhoeven and Tanke, "Influence of the Triplet Excited State on the Photobleaching Kinetics of Fluorescein in microscopy", *Biophysical Journal*, Vol. 70, p. 2959-2968, Giugno 1996.

Sumedha D. Jayasena, "Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics" *Clinical Chemistry*, Vol. 45(9), p. 1628-1650, 1999.

Susan M. Freier and Karl-Heinz Altmann "The ups and downs of nucleic acid duplex stability: structure-stability studies on chemically-modified DNA: RNA duplexes" *Nucleic Acids Research*, Vol. 25 (22), p. 4429-4443, 1997.

Vincent J. B. Ruigrok, Mark Levisson, Michel H. M. Eppink, Hauke Smidt and John Van Der Oost, "Alternative affinity tools: more attractive than antibodies?", *Biochem. J.*, Vol. 436, p. 1-13, 2011.

www.trilinkbiotech.com "Thermostability of Modified Oligonucleotide Duplexes".

Yong You, Andrey V Tataurov, and Richard Owczarzy, "Measuring thermodynamic details of DNA hybridization using fluorescence", *Biopolymers*, Vol. 95 (7), p. 472-486, Luglio 2011.

Zhiyong Mi, Hongtao Guo, M Benjamin Russell, Yingmiao Liu, Bruce A Sullenger and Paul C Kuo “RNA Aptamer Blockade of Osteopontin Inhibits Growth and Metastasis of MDA-MB231 Breast Cancer Cells”, *Molecular Therapy*, Vol. 17 (1), p. 153-161, Gennaio 2009.

Ringraziamenti

Prima di tutti ringrazio chi non c'è, ma sarebbe stato in prima fila oggi...il mio babbo. Mi avrebbe preso in giro per la mia ansia come faceva sempre il giorno in cui avevo un esame dicendo “sembra che tu stia per andare al patibolo!” e poi ci avrebbe portato tutti insieme a mangiare fuori, come piaceva a lui.

Ringrazio mamma per avermi sopportato sotto tesi, per il sostegno economico, per i consigli dispensati, perché unite è sempre meglio. Grazie alla mia sorellona per l'aiuto tecnologico per scrivere questa tesi, per le ore di shopping selvaggio (con colazione inclusa) che risollevano le giornate e perché...come potrei fare senza di lei?!

Ringrazio Jenny per le ore di compagnia durante lo studio (anche se lei russava) e quando ero malata.

Un grazie particolare va a Valentina, Diletta, Ilenia e Silvia. Senza di loro l'università sarebbe stata molto noiosa e probabilmente sarei ancora al primo anno! Valentina, sempre sorridente e pronta a darti una mano sia fisicamente che emotivamente, Diletta, la persona più positiva ed entusiasta del mondo che vede la bellezza anche in un viaggio in treno la sera di ritorno dall'università, Ilenia, tosta e fragile allo stesso tempo, con cui puoi parlare e ridere di tutto! E Silvia, la mia amiconna, compagna di studio e di chiacchierate tra i libri, di passeggiate e di merende, su cui posso sempre contare e che mi è stata vicino in tutti i momenti.

Grazie alle bimbe Silvia, Sarah e Susanna, le amiche di sempre con le quali ho passato e passerò i momenti migliori, più divertenti e spensierati! Che ricorderemo ridendo in una delle nostre seratine tra amiche. O negli incontri pomeridiani a base di cioccolata calda e gossip!

Grazie a tutti i componenti della Common Room del CNR (specialmente al gruppo dei Boss) perché hanno riempito di allegria le giornate di lavoro/studio!

Un grazie particolare alle bimbe del laboratorio 71: Paola, Maria Giovanna e Marta.

Grazie a Giamma, che con la sua pazienza mi ha sOpportato e sUpportato quando ne avevo bisogno, mi ha coccolato e fatta sentire importante.

Un ringraziamento speciale va a Lorena, grazie alla quale ho fatto questa bella esperienza di tesi, che mi ha seguito con pazienza (nonostante le mie insicurezze) e mi ha trasmesso il suo entusiasmo di conoscere e capire le cose.

Grazie alle farmaciste che ho incontrato durante il tirocinio, alla Farmacia Comunale 1 e a quella Ospedaliera, che mi hanno permesso di fare una nuova esperienza e dove mi sono sentita a casa.

Claudia